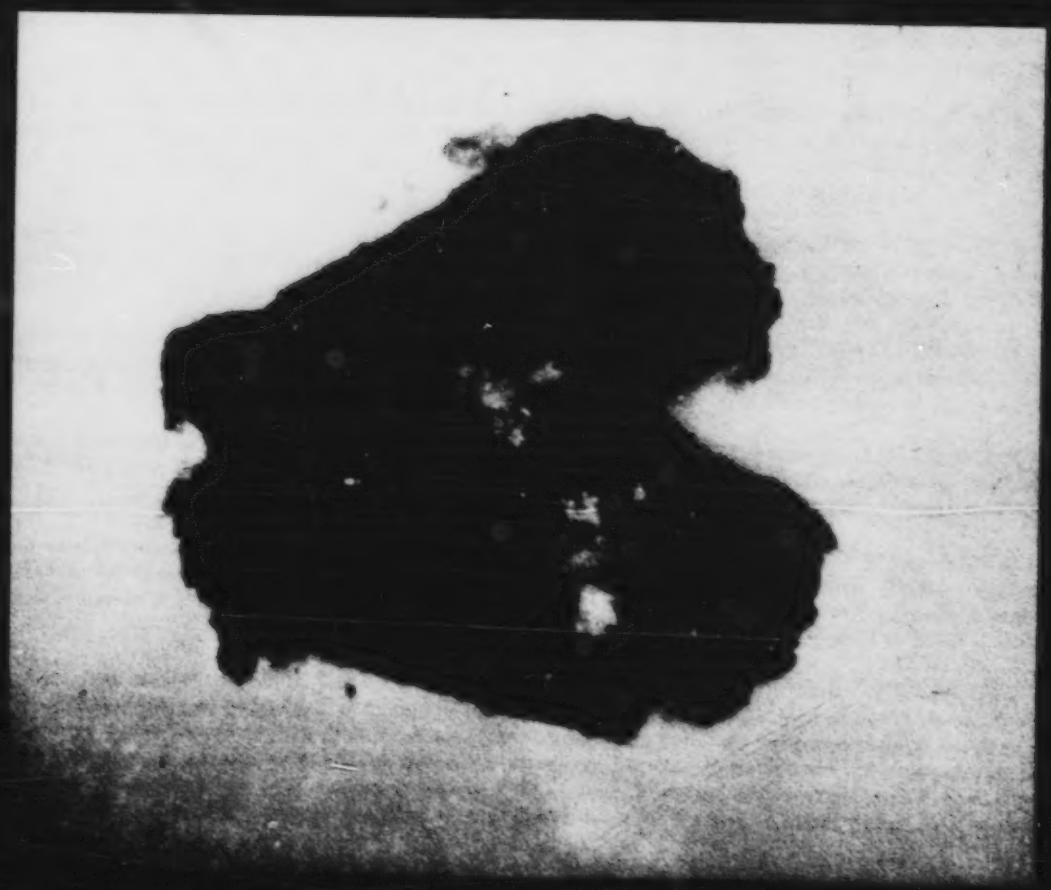
Gouvernement du Canada
Government of Canada

Service canadien des forêts
Canadian Forestry Service

Isolement, caractérisation et évaluation des souches *Frankia*

P. Normand, M. Lalonde, J.A. Fortin et L. Chatarpaul

Rapport d'information PI-X-30F
Institut forestier national de Petawawa



86-03967/

INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa, comme celui des autres établissements du Service canadien des forêts, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des activités des programmes menés à l'institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessistent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales du Service canadien des forêts. La plupart du temps, ses recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux ou des services forestiers des provinces. Les projets de recherche et les services techniques de l'institut sont regroupés sous six principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE - Ce programme encadre des projets sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à la clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Ce centre existe depuis longtemps et est lié à plusieurs organismes internationaux.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER - Ce programme intègre en recherche et développement, des projets sur les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance et la récolte, et le RIMA. Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LA RESSOURCE FORESTIÈRE - Communément appelé FORSTATS, ce programme assure la coordination de l'acquisition, de la normalisation et de la publication de statistiques nationales sur les forêts du Canada. Il est aussi chargé de répondre aux demandes de renseignements de la clientèle.

SYSTÈMES DE DONNÉES FORESTIÈRES - Ce programme fournit la compétence et les systèmes informatisés nécessaires à la gestion des données acquises dans le cadre de FORSTATS et des projets de recherche à l'IFNP. Il comprend en outre un service de consultation en informatique pour les hauts fonctionnaires du SCF.

COMMUNICATIONS - Ce programme regroupe les activités de la bibliothèque et des projets touchant la sensibilisation du public, l'information, la rédaction-révision et les publications. L'institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt national de toutes les publications scientifiques du SCF.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE - Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre de projets de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 98 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Ces plantations expérimentales permettent d'obtenir des données sur la croissance et la récolte à la suite d'expériences de culture. Elles fournissent du matériel génétique dont le lignage est répertorié, et se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. La forêt permet également de mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long terme.

Couverture:
Un nodule d'Alnus dont on a isolé Frankia en culture pure.

ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION DES SOUCHES *FRANKIA*

Rapport d'information PI-X-30F

P. Normand, M. Lalonde et J.A. Fortin
Faculté de foresterie
Université Laval, Québec (Québec)

L. Chatarpaul
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)

Institut forestier national de Petawawa
Service canadien des forêts
1985

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1985
Catalogue N° Fo46-11/30-1985F
ISSN 0228-0736
ISBN 0-662-93254-4

Des exemplaires de cette publication peuvent
être obtenus à l'adresse suivante:

Centre d'information technique et de distribution
Institut forester national de Petawawa
Service canadien des forêts
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

Téléphone: 613 589-2880

This publication is also available in English
under the title **The Isolation, Characterization, and Evaluation of *Frankia* strains.**

Le présent rapport a été rédigé suite à l'étude ENFOR P-198 qui a été realisée à contrat (dossier MAP: KL011-1-0020) par le Service canadien des forêts et l'Université Laval.

ENFOR est l'acronyme employé pour désigner le programme de recherche et développement ENergie de la FORêt (ENergy from the FORest) du gouvernement canadien dont l'objectif est d'acquérir des connaissances et des compétences techniques pour faciliter à moyen et à long terme un accroissement important de l'utilisation de la biomasse forestière pour la production d'énergie au pays. Ce programme fait partie d'une initiative beaucoup plus vaste du gouvernement fédéral en vue de favoriser l'exploitation et l'utilisation des formes d'énergie renouvelables de façon à réduire la dépendance vis-à-vis le pétrole et d'autres sources d'énergie non renouvelables.

Le Service canadien des forêts (SCF) est responsable de la partie du programme consacrée à la production de biomasse où l'on se penche sur des questions intéressant la forêt telles que les inventaires, les techniques de récolte, la sylviculture et les incidences environnementales. (L'autre partie du programme, intitulée <<Transformation de la biomasse>>, porte sur les techniques de transformation de la biomasse en énergie ou en combustibles; elle est la responsabilité de la Direction des énergies renouvelables du ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources.) La plupart des études sur la production de la biomasse, même si elles ont été élaborées par des scientifiques du SCF compte tenu des objectifs du programme ENFOR, sont réalisées à contrat par des consultants en foresterie et des chercheurs spécialistes. Les contrats sont octroyés conformément aux méthodes suivies par le ministère des Approvisionnements et Services pour les marchés scientifiques. On peut obtenir plus d'informations sur le sous-programme de production de la biomasse en s'adressant à un laboratoire de recherche du SCF ou en écrivant à l'adresse suivante:

Secrétariat du programme ENFOR
Service canadien des forêts
Ottawa (Ontario)
K1A 1G5

Table des matières

ix/x Résumé/Abstract

1 1. Introduction

3 2. Revue de littérature

3 2,1 Cycle de l'azote
3 2,2 Fixation de l'azote
5 2,3 Isolement des souches Frankia
9 2,4 Caractérisation des isolats Frankia

9 2,4,1 Milieu et morphologie
11 2,4,2 Tests d'infectivité et essais biochimiques
11 2,4,3 Caractérisation des isolats à l'aide de l'analyse des sucres

12 2,5 Évaluation des isolats Frankia

12 2,5,1 Essai de réduction à l'acétylène
13 2,5,2 Essais de $^{15}N_2$
13 2,5,3 Production de biomasse en l'absence de N

13 2,6 Stérilisants pour la germination axénique d'Alnus crispa

15 3. Matériel et méthodes

15 3,1 Isolement des souches

15 3,1,1 Stérilisation de surface
15 3,1,2 Sous-cultures des isolats
16 3,1,3 Essais d'infectivité
16 3,1,4 Essais de réduction à l'acétylène
16 3,1,5 Lyophilisation

16 3,2 Caractérisation des souches

17 3,2,1 Localisation des sucres
17 3,2,2 Dérivés de l'acétate alditol
18 3,2,3 Dérivés du triméthylsilyl

18 3,3 Évaluation des souches
18 3,4 Évaluation des stérilisants

20 4. Résultats

20 4,1 Isolement des souches

20 4,1,1 Sous-culture et croissance
23 4,1,2 Morphologie des isolats
23 4,1,3 Infectivité

23 4,1,4 Observation microscopique des sections de nodosités
24 4,1,5 Essai de réduction à l'acétylène
24 4,1,6 Lyophilisation

24 4,2 Caractérisation des souches

24 4,2,1 Localisation des sucres
26 4,2,2 Dérivés du triméthylsilyl

26 4,3 Évaluation des souches
27 4,4 Évaluation des stérilisants de surface

29 5. Discussion

29 5,1 Isolement des souches

29 5,1,1 Morphologie et infectivité
29 5,1,2 Distributions Sp^+/Sp^-
31 5,1,3 Conditions de croissance

31 5,2 Caractérisation des isolats

32 5,3 Évaluation des isolats

34 5,4 Évaluation des stérilisants

36 6. Conclusions

38 7. Références

47 Annexe A. Signification des acronymes

51 Annexe B. Figures

Tableaux

4 1. Certains habitats communs des espèces actinorhizes
7 2. Composition des milieux utilisés pour la culture de Frankia
8 3. Comparaison des cinq méthodes d'isolement
10 4. Liste des collections de Frankia
21 5. Liste des origines
25 6. Liste des 14 isolats testés comme endophytes pour la réduction à l'acétylène
25 7. Liste des souches Frankia testées pour leurs sucres par leurs dérivés d'acétate alditol
26 8. Hauteur des semis (moyenne ±SD)
26 9. Poids frais des semis (moyenne ±SD)
48 10. Liste des genres et des espèces de plantes actinorhizes et acronymes proposés

Figures

52 1. Carte des lieux d'origine dans le sud du Québec.
53 2. Microphotographie de l'isolat ACN14a.
54 3. Microphotographie de l'isolat MGP10i.
55 4. Microphotographie de l'isolat ARgP5^{AG}.
56 5. Microphotographie de l'isolat ARgP5^{AG}AC
57 6. Microphotographie de l'isolat ACN8a.
58 7. Microphotographie de l'isolat SCN10a.
59 8. Nodosités obtenues de l'isolat ACP17b.
60 9. Chromatogramme des sucres de l'isolat Frankia TN15$^{AG}_{a}$ et Actinoplanes philippinensis.
61 10. Chromatogramme des fractions <<filtre>> et <<filtrat>> de ARgP5^{AG} après broyage.
62 11. Graphique de la teneur en N vs la hauteur (données brutes).
63 12. Graphique de la teneur en N vs la hauteur (données transformées).
64 13. Photographie d'A. crispa inoculée avec ACN11m et ACN14c (test n° 2).
65 14. Photographie d'A. crispa inoculée avec les isolats AVP3d, ACN10a, ArgP5^{AG}, AVP3f, ACN8c, ACN11a et ACN11b (test n° 1).
66 15. Photographies d'A. crispa inoculée avec les isolats AVP3m, ARgN14b, MGP10a, ARgN22d, ACP17b et TN15$^{AG}_{b}$ (test n° 3).
67 16. Pourcentage de graines stériles germées (16a) et de graines stériles utilisables (16b) donnant des semis axéniques et normaux après un traitement avec divers stérilisants.

RÉSUMÉ

Le tétroxyde d'osmium (OsO_4) a servi de stérilisant pour l'isolement de Frankia, endophyte fixateur de l'azote dans les nodules de plantes hôtes. On a ainsi obtenu 250 isolats en culture pure à partir de plusieurs Alnus (A. crispa, A. rugosa, A. viridis, A. glutinosa et A. serrulata) ainsi que d'autres espèces non-légumineuses du Québec capables de fixer l'azote (Myrica gale et Shepherdia canadensis). C'est la première fois que de tels isolats sont signalés chez A. viridis et S. canadensis.

Les sucres de l'hydrolysat de cellules entières des organismes ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse afin d'identifier de façon positive les souches préalablement sélectionnées d'après leur morphologie et leur infectivité. Cette technique s'est révélée particulièrement utile dans le cas des isolats dont la morphologie était atypique (ACN8, ARgN22, SCN9 et SCN10). De plus, l'analyse des sucres (du 2-O-méthyle-D-mannose notamment) peut grandement aider à déterminer la taxonomie de Frankia.

La capacité à fixer l'azote de certaines souches Frankia a été mesurée après leur inoculation sur A. crispa. On a constaté qu'elle ne dépendait pas de l'hôte dont les organismes avaient d'abord été isolés. Toutefois, certains isolats de même origine différaient grandement sur ce point, et les souches Frankia qui ne sporulaient pas fixaient mieux l'azote que les autres. Il est proposé de désigner par <<type P>> et <<type N>> les souches Frankia à sporulation positive (Sp^+) et négative (Sp^-) respectivement, et il est recommandé que le type de sporulation serve à la définition taxonomique du genre Frankia.

ABSTRACT

Osmium tetroxide (OsO_4) was used as the sterilizing agent to isolate the nitrogen-fixing endophyte Frankia from nodules of host plants. This treatment resulted in a pure culture collection of 250 Frankia isolates from several species of Alnus (crispa, rugosa, viridis, glutinosa, and serrulata) and from other actinorhizal species from Quebec (Myrica gale and Shepherdia canadensis). Frankia isolates from A. viridis and S. canadensis are reported here for the first time.

Sugars from whole-cell hydrolysates of the organisms were analysed by gas liquid chromatography (GLC) to identify strains previously screened on the basis of morphology and infectivity. This technique proved especially useful for those isolates whose morphology was atypical (ACN8, ARgN22, SCN9, and SCN10). It was demonstrated that sugar analysis (2-O-methy-D-mannose, in particular) can be important in resolving the taxonomy of Frankia.

The nitrogen-fixing efficiency of some Frankia strains was evaluated by inoculating A. crispa. It was found that the efficiency of organisms was not influenced by the host from which they were first isolated. However, significant differences between some isolates of the same provenance occurred. It was also found that those strains of Frankia which do not sporulate were more effective in fixing nitrogen than those which do. It is proposed that the terms "Type P" and "Type N" be used to designate spore positive (Sp^+) and spore negative (Sp^-) Frankia strains, respectively. Further, it is recommended that "sporulation type" be used as a valid basis for species definition in the genus Frankia.

ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION DES SOUCHES FRANKIA

P. Normand, M. Lalonde, J.A. Fortin et L. Chatarpaul

1. INTRODUCTION

Au cours des dernières années, les ressources forestières du monde entier ont fait l'objet de pressions sans cesse croissantes. Non seulement on exploite encore davantage les forêts pour en tirer un plus grand nombre de produits de type classique, mais également, depuis la crise mondiale de l'énergie, on cherche à en tirer des combustibles liquides, solides et gazeux pour remplacer, au moins en partie, les combustibles fossiles devenus rares. Les systèmes de sylviculture et d'exploitation forestière ont été perfectionnés afin de produire davantage de fibres par unité de superficie sur les sites dont l'accès n'est pas trop difficile. Cette augmentation du rendement par l'utilisation des arbres entiers, alliée au raccourcissement des périodes de rotation, créera inévitablement des pressions accrues sur la capacité nutritive des sols forestiers, dont la fertilité est généralement faible. Ces sols devront par conséquent être bien gérés si l'on veut que leur productivité demeure optimale.

L'azote est essentiel à la vie. En effet, cet élément est un paramètre limite pour la productivité de nombreux écosystèmes (Campbell, 1977). L'azote se trouve dans les acides aminés, les acides nucléiques, la chlorophylle, les cytochromes, les vitamines et autres molécules des tissus vivants.

Dans une communauté à maturité, des éléments tels que le phosphore ou le soufre peuvent devenir des paramètres-limites (Postgate, 1979), mais dans des zones perturbées telles que le tills glaciaires (Ugolini, 1968), les dunes de sable (Dommergues, 1966) ou les sites brûlés (Wollum et Davey, 1975), les sols affichent souvent une déficience en azote. En général, on s'accorde pour dire que la plupart des forêts du Canada devraient réagir favorablement à une fertilisation à l'azote.

Dans les forêts récemment rasées, l'azote est souvent libéré en quantités qui varient selon la méthode de récolte et la période de rotation (Tran Van Nao, 1974). L'enlèvement des tiges marchandes représente une perte nette de 40 à 400 kg N ha^{-1}. La perte de N est considérablement supérieure lorsque l'arbre est coupé en entier et lorsque la période de rotation est réduite de 40 à 20 ans (Tran Van Nao, 1974). Armson (1977) a noté que la perte d'azote dans les écosystèmes forestiers a généralement plus d'impact que les pertes de phosphore ou de potassium.

La fixation biologique de l'azote est considérée comme une façon d'augmenter l'apport en azote dans les systèmes de foresterie intensive. Les symbioses fixatrices de N avec des nodosités d'actinomycètes, telles que Alnus/Frankia, se prêtent bien à cette application en foresterie (Tarrant et Trappe, 1971).

Plusieurs gouvernements et compagnies privées (Crown Zellerbach, Weyerhauser et McMillan Bloedel) subventionnent la recherche dans ce secteur

(Rottink, 1980). Parmi les nombreuses méthodes envisagées pour produire de la biomasse comme source d'énergie et transférer dans l'écosystème l'azote fixé par des espèces symbiotiques, mentionnons les cultures mixtes, la rotation des cultures et l'utilisation d'arbres et d'arbustes fixateurs de l'azote dans les zones perturbées (Rottink et al., 1979). Alnus crispa et A. rugosa sont actuellement à l'étude pour fins de <<plantation énergétique>> au Québec (Fortin et al., 1979).

On connaît relativement peu de chose sur la biologie de Frankia, l'endophyte qui forme une symbiose fixatrice de l'azote avec Alnus. Cela est dû en partie aux difficultés que pose l'isolement de Frankia en culture pure. Selon Hall et al. (1979), la tenue d'un programme d'isolement, de caractérisation et d'évaluation de Frankia est une condition préalable à l'utilisation de cette symbiose en foresterie. Par exemple, tout travail sérieux sur la sélection de souches supérieures de Frankia dépend de l'accès à une banque de culture de souches provenant de l'endroit où l'application en question est envisagée.

Le but de cette étude était de monter une collection importante de souches Frankia en culture pure en ajoutant aux collections de Lalonde et al. (1981) de nouveaux isolats provenant de plantes hôtes natives de l'est du Canada. Ses objectifs secondaires étaient les suivants: confirmer l'identité des souches isolées à l'aide d'essais biochimiques, évaluer l'efficacité à fixer l'azote de certaines des souches en inoculant de nouveau Alnus crispa et évaluer l'efficacité des stérilisants de surface. Nous présentons également une revue de la littérature pertinente.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2,1 Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est l'un des plus complexes des cycles biogéochimiques (Campbell, 1977). L'azote se retrouve sous forme de nombreux composés différents à divers degrés d'oxydation et est transformé de nombreuses façons, notamment par des processus biologiques (Postgate, 1978). L'azote gazeux (N_2) constitue près de 80 % de l'atmosphère, mais s'y trouve sous une forme non disponible pour la plupart des organismes, y compris les plantes. L'azote disponible, habituellement sous forme d'ions d'ammonium et de nitrate, est libéré de l'écosystème par des processus tels que la dénitrification, la volatilisation, le lessivage, ou encore par l'enlèvement de la biomasse (Russel, 1973). En régime permanent, ces pertes peuvent être compensées par fixation chimique et biologique, ainsi que par les apports d'oxyde d'azote et d'ammonium provenant des précipitations (Wollum et Davey, 1975).

La tendance actuelle en foresterie à intensifier l'exploitation afin de produire un plus grand nombre de fibres pourrait entraîner des déficiences chroniques d'azote dans le sol. Les apports naturels par minéralisation et précipitation ne seront plus suffisants pour répondre aux besoins en azote des forêts. Restent deux possibilités: i) fournir un supplément d'azote aux forêts sous forme de fertilisants chimiques ou ii) adopter de nouvelles méthodes de foresterie telles que la fixation biologique de l'azote suggérée par Beuter (1979). Dans certaines conditions, l'utilisation de fertilisants chimiques peut présenter des avantages. Toutefois, compte tenu de la demande actuelle en fertilisants et des prix courants, il est peu probable que l'on procède à la fertilisation intensive des vastes forêts canadiennes. Les techniques biologiques telles que la fixation de l'azote pour maintenir la fertilité des sols présentent par contre des possibilités intéressantes (Rottink et al., 1979), notamment dans les plantations intensives ou dans les forêts soumises à de courtes périodes de rotation.

2,2 Fixation de l'azote

L'azote que l'on trouve dans l'atmosphère et dans le sol de la Terre a probablement été produit, comme sur Mars ou sur Vénus, par la lente dégradation de la croûte (Pollack, 1981), mais cet apport est maintenant marginal. Le même raisonnement vaut pour les apports provenant des précipitations, qui ne répondent que pour seulement 1 à 15 % de notre demande en azote (Armson, 1977). L'apport le plus important vient donc, sur une base globale, de la fixation.

La fixation de l'azote se fait par deux voies principales: i) le processus chimique Harber-Bosch ou ii) le processus enzymatique, mettant en jeu la nitrogénase, une enzyme que l'on trouve seulement dans certains procaryotes (Ruvkun et Ausubel, 1980). À l'heure actuelle, on estime qu'environ 100 milliards de tonnes métriques d'azote sont fixées annuellement, la moitié l'étant dans des usines au moyen du processus coûteux Harber-Bosch, qui consomme du méthane pour atteindre les 500°C et les 200 à 1000 atmosphères nécessaires pour compléter la réaction. D'autre part, de nombreux microorganismes fixateurs de l'azote fixent 50 milliards de tonnes métriques à une pression et une température normales (Campbell, 1977).

Deux grands groupes de plantes ont établi une association symbiotique avec les procaryotes fixateurs de l'azote (Maynard, 1980). Il s'agit des légumineuses, en symbiose avec Rhizobium, et des plantes actinorhizes, en symbiose avec Frankia. Il existe également d'autres symbioses fixatrices de l'azote telles que celles des cycades ou des nodules foliaires de Psychotria (Van Hove, 1976), mais ces systèmes symbiotiques ne sont pas répandus, sont limités aux tropiques et n'ont qu'un faible potentiel d'exploitation commerciale dans un avenir rapproché. Les forêts boréales contiennent seulement des légumineuses herbacées (Marie-Victorin, 1964). Peu de ces dernières peuvent avoir des applications pratiques telles que la sous-plantation (Zavitkovski et al., 1979) parce que, entre autres raisons, elles sont moins résistantes au gel que les espèces d'aulne (Maynard, 1980). Par ailleurs, les espèces actinorhizes sont des plantes pionnières qui se développent bien dans une variété d'écosystèmes extrêmes, tel qu'on peut le voir au tableau 1.

Tableau 1. Certains habitats communs des espèces actinorhizes

Habitat	Espèce	Source
Tills glaciaires	Dryas drummondii	Crocker et Major (1955)
	Shepherdia canadensis	Crocker et Major (1955)
	Alnus spp.	Crocker et Major (1955)
Dépôts de laves	Myrica faya	Smathers et Gardner (1979)
	Alnus spp.	Hunt et Trappe (1981)
	Coriaria spp.	Silvester et al. (1979)
Zones de coupe rase	Alnus spp.	Resch (1980)
Zones brûlées	Ceanothus	Youngberg et Wollum (1976)
	Cercocarpus	Hoeppel et Wollum (1971)
Hautes altitudes	Alnus viridis	Moiroud et Copellano (1979)
Déserts	Chamaebatia foliolosa	Heisey et al. (1980)
	Cowania mexicana	Righetti et Munns (1980)
	Datisca glomerata	Winship et Chandhary (1979)
	Purshia spp.	Dalton et Zobel (1977)
Dunes de sable	Hippophaë rhamnoides	Akkermans (1971)
	Casuarina spp.	Dommergues (1966)
	Myrica spp.	Morris et al. (1974)
Dépôts de mousse	Myrica gale	Bond (1951)
Stériles de mine	Alnus glutinosa	Carpenter et Hensley (1979)
Dépôts de gravier	Alnus viridis	Benecke (1970)
	Dryas drummondii	Petrides (1958)
Falaises de craie	Elaeagnus commutata	Marie-Victorin (1964)

2,3 Isolement des souches Frankia

Depuis le début du siècle, plus de 40 mémoires ont été publiés sur des tentatives infructueuses d'isoler Frankia (Baker et Torrey, 1979). Parmi les raisons invoquées pour expliquer ces échecs, mentionnons les suivantes: i) la faible vitesse de croissance des actinomycètes en général et de Frankia en particulier comparativement aux eubactéries (Baker et Torrey, 1979); ii) la présence, dans les nodosités, de quantités importantes de composés phénoliques qui pourraient avoir un effet inhibiteur pour Frankia; ces composés sont libérés dans le milieu de croissance au broyage (Baker et al., 1979a); iii) la nécesssité d'une inoculation massive du milieu (Quispel et Burggraaf, 1981); iv) l'incertitude concernant la demande en oxygène de Frankia (Lalonde et al., 1975); v) les exigences de croissance qui étaient inconnues à cause de la confusion au sujet de l'identité de l'endophyte (Baker et Torrey, 1979); vi) les besoins de croissance spéciaux de certaines souches (Quispel et Burggraaf, 1981), notamment lorsqu'elles sont cultivées à l'extérieur de la nodosité (Lalonde et Calvert, 1979); et finalement, vii) selon Baker et Torrey (1979), la sous-estimation générale de la complexité du processus d'isolement de Frankia en culture pure.

Pour illustrer les problèmes rencontrés dans l'isolement de Frankia, on fait la comparaison suivante avec la culture de Rhizobium en fonction de certains paramètres clés:

i) Vitesse de croissance: Rhizobium, comme de nombreuses autres eubactéries, produit des colonies visibles sur gélose après deux ou trois jours, tandis qu'il faut à Frankia entre deux semaines et deux mois pour en faire autant. Bien que certains actinomycètes, tels que les espèces de Streptomyces, croissent rapidement sur gélose, d'autres affichent une croissance beaucoup plus lente (Athalye et al., 1981). Frankia, par conséquent, sera supplanté par presque tout contaminant. Le fait que Frankia pousse plus lentement sur gélose que dans un milieu liquide complique encore son isolement (Callaham et al., 1978).

ii) Phénols: Les plantes actinorhizes sont toutes des dicotylédones ligneuses, à l'exception de Datisca (Akkermans et Houwers, 1979), et la biochimie des nodosités actinorhizes est différente de celle des nodosités de légumineuses; la quantité de composés phénoliques est plus importante dans les premières que dans les dernières. Cela ressort du rougissement des nodosités au broyage. Il est nécessaire d'avoir recours à la pyrrolidone de polyvinyle (Loomis et Battaille, 1966) ou à des techniques telles que la chromatographie Sephadex (Baker et al., 1979a) ou la centrifugation de gradient de densité au sucrose (Baker et al., 1979b) pour prévenir l'oxydation des phénols, qui semblent avoir un effet inhibiteur sur la croissance de Frankia.

iii) Inoculation massive: Il n'est pas nécessaire de procéder à l'inoculation massive du milieu pour isoler les souches de Rhizobium en culture pure. Toutefois, Quispel et Burggraaf (1981) ont noté la nécessité d'une telle inoculation avec les souches Frankia; à cause de la lenteur de la croissance de Frankia comparativement aux contaminants, une stérilisation poussée de la surface de la nodosité est également nécessaire.

iv) pO_2: Avant que Callaham et al. (1978) réussissent à l'isoler pour la première fois, on pensait que Frankia était micro-aérophile (Lalonde et al.,

1975) à cause du grand nombre de couches entourant l'endophyte (Lalonde et Knowles, 1975a) et de l'absence d'hémoglobine (Bond, 1951) pour protéger la nitrogénase sensible à O_2. De nombreuses tentatives d'isoler Frankia ont peut-être échoué pour cette raison (Baker et Torrey, 1979). On sait aujourd'hui que le pO_2 des espaces intercellulaires de la nodosité est d'environ 20 % (Tjepkema, 1979) et que les nodosités actinorhizes ont également un pO_2 optimal pour la fixation d'environ 20 % (Sloger, 1968; Fessenden et al., 1973). Tjepkema et al. (1980) ont noté que Frankia semble micro-aérophile dans l'expression nitrogénase in vitro. D'autres rapports ont décrit la nitrogénase comme anaérobie (Benson et al., 1979) ou aérobie pour la croissance végétative in vitro (Burggraaf et al., 1981). Toutefois, Baker et al. (1981a) et Lechevalier et Lechevalier (1979) préfèrent classifier Frankia entre micro-aérophile et aérobie.

v) Identité de l'endophyte: On sait depuis maintenant longtemps que Rhizobium est une eubactérie dont les besoins nutritifs simples sont bien définis (Vincent, 1977). Frankia, de son côté, a été classé de diverses façons, comme un champignon micorhize, un myxomycète, une eubactérie ou un actinomycète et, donc, les conditions de croissance utilisées pour l'isolement en culture pure n'étaient pas optimales (Baker et Torrey, 1979). Les recherches sur les caractéristiques biochimiques de Frankia viennent tout juste de commencer (Blom, 1981).

vi) Besoins nutritionnels: Pour toutes les espèces de Rhizobium, un milieu contenant de l'extrait de levure et un sucre suffit (Vincent, 1977). Mais Frankia isolé d'Alnus, par exemple, a montré une grande diversité dans ses besoins de croissance (Quispel et Burggraaf, 1981). Ainsi, l'isolat désigné AvcIl a affiché des caractéristiques très variables dans ses sources de carbone et d'azote (Blom, 1981). Cela était prévisible du fait qu'il avait été isolé sur un <<bouillon de Frankia>> (Baker et Torrey, 1980), un milieu simple (tableau 2). À l'autre extrémité du spectre, des souches isolées de nodosités d'A. glutinosa Sp^+ et Sp^- ont présenté une croissance de négligeable à lente à moins d'être additionnée d'un extrait de lipide alcoolique tiré de racines d'aulne (Quispel et Burggraaf, 1981). Cela ressemble à la croissance améliorée de certains isolats Sp^+ observés dans des sous-cultures en milieu Qmod B additionné de FBS (sérum bovin foetal, Gibco, Grand Island, NY) (Lalonde, inédit).

Habituellement, la première croissance à l'extérieur de la nodosité est plus lente que celle des cultures subséquentes. Les besoins de croissance sont également plus importants pendant cette phase de transition vers de nouvelles conditions artificielles (Lalonde, inédit).

Certaines méthodes très compliquées pour isoler Frankia en culture pure ont fait l'objet de rapports (Quispel, 1955, 1979; Callaham et al., 1979; Burggraaf et al., 1981). Des méthodes plus simples ont été proposées, telles que celles de Gel'tser (1965). Toutefois, aucune de ces méthodes ne s'est révélée efficace. Le tableau 3 compare cinq des méthodes d'isolement les plus efficaces.

On admet généralement que les premiers à avoir isolé Frankia efficacement sont Callaham et al. (1978). Ces chercheurs ont fait macérer des nodules de Comptonia peregrina dans une solution de pectinase-cellulase afin de libérer les grappes d'hyphes et de vésicules. Ce procédé a donné, de nombreuses

Tableau 2. Composition des milieux utilisés pour la culture de Frankia

	<<A>> 1re isol.	<<B>> Bouillon Frankia	<<C>> Qmod B	<<D>> TOT	<<E>> Kalininskaya
Extrait de levure	500	5000	500	-	80
FeNaEDTA	-	-	-	10	-
$FeCl_3 6H_2O$	-	-	-	-	10
Citrate ferrique	-	-	0,01	-	-
NaH_2PO_4	-	-	200	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	200	-	200	100	290
KH_2PO_4	-	-	-	1000	870
K_2HPO_4	500	-	300	-	1670
$CaCO_3$	500	-	100	-	-
$CaCl_2$	-	-	-	10	70
NaCl	100	-	-	-	480
KCl	-	-	200	-	-
Malate	-	-	-	-	2320
Acide succinique	-	-	-	1200	-
Mannitol	1000	-	-	-	-
Sucrose	20000	-	-	-	-
Dextrose	-	10000	-	-	-
Glucose	-	-	10000	-	-
Acides casaminés	-	5000	-	-	-
Bactopeptone	-	-	5000	-	-
Edamin	1000	-	-	-	-
Lécithine	-	-	5	-	-
Vitamine B_{12}	-	1,6	-	-	-
Pyridoxine	0,1	-	-	0,5	-
Thiamine	0,1	-	-	0,1	-
Acide nicotinique	0,5	-	-	0,5	-
Biotin	-	-	-	-	0,02
$MnSO_4(xH_2O)$	25(1)	4,5(1)	0,8(7)	-	3(4)
$MgCl_2.2H_2O$	-	-	-	1,8	-
H_3BO_3	100	1,5	1,5	2,9	5
$ZnSo_4.(xH_2O)$	10(1)	1,5(7)	-0,6(7)	0,2(7)	0,2(7)
$Na_2Mo_4.2H_2O$	0,25	0,25	-	0,025	5
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	-	-	0,2	-	-
$CuSo_4.(xH_2O)$	0,025(1)	0,04(1)	0,1(7)	-	-
$CoSO_4.7H_2O$	-	-	0,01	-	0,002
pH	7	6,4	6,8-7,0	6,8	7,0

Le tableau 2 présente les milieux utilisés par Callaham et al. (1978): Milieu <<A>>, Baker et Torrey (1979); milieu <<B>>, Lalonde et Calvert (1979); milieu <<C>>, Tjepkema et al. (1980); milieu <<D>>, Gauthier et al. (1981); milieu <<E>>. Toutes les quantités sont exprimées en mg L^{-1}. Les milieux <<A>>, <<B>> et <<C>> ont été utilisés pour l'isolement et le milieu <<D>> pour l'expression *in vitro* de la nitrogénase.

Tableau 3. Comparaison des cinq méthodes d'isolement

	Digestion enzymatique	Dilution en série	Gradient de sucrose	Incubation sélective	Traitement OsO_4
Complexité[a]	très élevé	faible	élevé	élevé	faible
Taux de succès[b]	très élevé	faible	moyen	moyen	élevé
Vitesse de croissance[c]	faible (2 mois)	faible (2 mois)	faible (2 mois)	faible (2 mois)	élevé (2 sem.)
Nombre d'isolats distincts du nodule	faible	faible	faible	élevé	élevé
Toxicité	faible	faible	faible	moyen	élevé

a) temps, manipulations et matériel requis.
b) d'après Baker et al. (1979b) pour le gradient de sucrose; d'après Quispel (1979) et Quispel et Burggraaf (1981) pour l'incubation sélective; d'après Lalonde (1979a) et notre laboratoire pour la dilution en série; d'après Lalonde et al. (1981) et notre laboratoire pour le traitement au OsO_4. Ne s'applique pas à la digestion enzymatique (Callaham et al., 1978; Baker et Torrey, 1979), qui n'a réussi qu'une seule fois.
c) temps nécessaire à l'apparition de colonies visibles à l'oeil nu.

semaines plus tard, des colonies de Frankia. Depuis lors, d'autres méthodes qui ont réussi à isoler des souches Frankia en culture pure ont été mises au point. Par exemple, Lalonde (1979a) a isolé deux souches Frankia, $ACNI^{AG}$ et $CPNI^{AG}$, à l'aide d'une méthode de dilution en série à partir de semis d'A. glutinosa dans un milieu Qmod B (Lalonde et Calvert, 1979). La même méthode a été utilisée par Gauthier et al. (1981) sur des nodules de Casuarina.

Baker et al. (1979b) ont décrit une méthode basée sur la centrifugation de gradient de densité au sucrose pour séparer les hyphes et les vésicules des débris de nodosités, des phénols et d'autres contaminants et ont réussi à isoler des souches de EuI1 à partir d'Elaeagnus umbellata ainsi que des souches de AvcI1 à partir d'Alnus crispa (Baker et al., 1980) à l'aide d'un <<bouillon de Frankia>> (Baker et Torrey, 1979). La même méthode a été utilisée par Lechevalier (communication personnelle) pour isoler MpI1 et AirI à partir respectivement de Myrica pensylvanica et A. rugosa.

Burggraaf et al. (1981) ont mis au point une technique d'incubation sélective pour isoler des souches Frankia à partir d'A. glutinosa et M. gale. Brièvement, leur méthode consiste à stériliser la surface des nodosités avec 0,1 % de brome, à disséquer les nodosités afin d'en retirer l'épiderme riche en tanin et à incuber le tout afin d'obtenir des conditions axéniques. Les nodosités sont ensuite broyées, filtrées et leur contenu incubé dans une couche supérieure de gélose (0,8 %) contenant des peptones et des lipides et

placées sur une gélose inférieure (1 %) contenant les autres ingrédients du milieu Qmod.

Lalonde et al. (1981) ont décrit une méthode efficace faisant appel à du tétroxyde d'osmium (OsO_4) pour tuer tous les contaminants de surface de même que ceux des fissures épidermiques qui échappent souvent à la stérilisation classique. Une solution aqueuse pds/vol. à 3 % de OsO_4 est appliquée aux nodosités qui sont ensuite broyées dans le PVP pour absorber les phénols. Par la suite, la bouillie obtenue est inoculée dans des tubes Qmod B. Des souches Frankia provenant d'Alnus glutinosa, A. serrulata, A. tenuifolia, A. rubra, Elaeagnus umbellata et E. augustifolia ont été isolées à l'aide de cette méthode (Lalonde et al., 1981).

De nombreux laboratoires ont déjà isolé et isolent encore des souches Frankia à partir des genres Alnus, Myrica, Comptonia, Elaeagnus, Shepherdia, Hippophaë, Purshia, Ceanothus et Casuarina (voir tableau 4).

Les collections d'isolats Frankia sont importantes pour la recherche biologique et ses applications pratiques. Parmi ces applications, mentionnons la production de biomasse, la recolonisation des stériles de mine et d'autres sites perturbés, de même que les plantations mixtes et l'amendement des sols. La liste de collections de Frankia donnée au tableau 4 pourrait être incomplète, tous les résultats n'ayant pas été publiés.

2,4 Caractérisation des isolats Frankia

Le premier isolat obtenu a été caractérisé selon ses caractéristiques morphologiques et sa capacité à former des nodosités, bref, de façon à confirmer les postulats de Koch (Callaham et al., 1978). Les caractéristiques morphologiques sont encore le critère le plus largement utilisé.

2,4,1 Milieu et morphologie

Le milieu dans lequel on fait la culture de Frankia a un effet sur sa morphologie et sa vitesse de croissance. Par exemple, selon Blom et al. (1980), une modification de la source de lipides - la lécithine remplacée par Tween (Sigma Chem. Co., St-Louis, Mo.) dans le milieu Qmod B - a pour effet de doubler la teneur en carbone organique totale et, selon Lalonde et Calvert (1979), le sérum bovin foetal retarde la sporulation. Par ailleurs, Frankia est un micro-organisme pléomorphique dont le développement est séquentiel (Lalonde et Calvert, 1979). Tout changement dans les conditions de croissance auront des répercussions considérables sur sa morphologie. Par exemple, à l'isolement, le nombre et la taille des sporanges augmentent et le nombre de vésicules diminue par rapport au stade endophytique (Callaham et al., 1978). En outre, certaines souches Frankia sont plus sensibles que d'autres à la présence de certains composés lipides dans le milieu (Quispel et Burggraaf, 1981). Il semble donc qu'il faille choisir le milieu le plus complet possible, particulièrement pour l'isolement, afin d'éviter la sélection pour des besoins de croissance plus simples. Le milieu choisi par Lalonde et Calvert (1979) (tableau 2, <<B>>), ainsi que par Quispel et Burggraaf (1981), semble convenir à une large gamme de souches. Ce milieu permet l'isolement de diverses souches, notamment les souches Sp^-, avec un haut degré de succès. De plus, comme il semble que les modifications dans les conditions de croissance entraînent des modifications morphologiques pour de nombreux actinomycètes en

Tableau 4. Liste des collections de Frankia

Lieu	Auteur(s)	Source des isolats de Frankia	
Laval	Lalonde et Normand	Alnus crispa rugosa tenuifolia rubra viridis serrulata glutinosa	Myrica gale Comptonia peregrina[H] Elaeagnus umbellata " angustifolia Shepherdia canadensis
Middlebury	Baker	Alnus rugosa rubra rugosa sinuata Comptonia peregrina	Myrica gale " cerifera Elaeagnus commutata " umbellata Purshia tridentata
Pays-Bas	Quispel et Burggraaf	Alnus glutinosa crispa[M]	Myrica gale Comptonia peregrina[H]
Rutgers	Lechevalier Autres	Alnus rugosa Myrica pensylvanica	Ceanothus americanus
Harvard Forest	Berry, Callaham, et Torrey	Alnus rubra	Comptonia peregrina
Weyerhauser	Carpentier et Robertson	Alnus rubra	Alnus sinuata
Dakar	Gauthier, Domergues, et Diem	Casuarina equisetifolia	Hippophaë rhamnoides
Lyon	Moiroud et Simonet	Alnus viridis incana glutinosa	Alnus rugosa[L] " rubra[L] " crispa[L]
Connecticut	Benson	Alnus rugosa	

Les lettres placées en haut à droite des mots indiquent la provenance des souches. (H = Harvard; M = Middlebury; L = Laval).

sous-culture (Waksman, 1959), le même milieu utilisé pour l'isolement devrait également servir pour les sous-cultures subséquentes, à moins que des modifications à la morphologie ou au métabolisme soient nécessaires (Tjepkema et al., 1980).

Une fois choisi le milieu pour l'isolement et la sous-culture, on peut identifier un isolat comme souche Frankia à partir de ses caractéristiques morphologiques si la majorité des critères morphologiques décrits par Lalonde et Calvert (1979) sont présents; ces critéres sont, par exemple, les hyphes

cloisonnés ramifiés, les vésicules pédonculées et les sporanges contenant des spores non mobiles.

2,4,2 Tests d'infectivité et essais biochimiques

Un autre critère utilisé pour identifier un isolat comme Frankia est la capacité à entraîner la formation de nodosités fixatrices de l'azote sur une plante hôte compatible (Lalonde, 1979a; Lechevalier et Lechevalier, 1979).

Des critères biochimiques ont également été adaptés récemment en vue d'identifier Frankia. Parmi ces critères, mentionnons la procédure Ouchterlony, qui permet l'inclusion d'un isolat donné dans un sérogroupe (Baker et al., 1981b), la chromatographie sur sucre des hydrolysats de cellules entières qui donne une <<empreinte>> que l'on peut comparer à celle d'un Frankia confirmé (Mort et Lalonde, 1981), et l'établissement de la structure de la paroi cellulaire. Dans les souches Frankia, la structure de la paroi cellulaire est de type III parce qu'elle comprend de l'acide mésodiaminopimélique (méso-DAP), de l'alanine, de la glucosamine, un acide aminé inconnu, et un hexose inconnu (Lechevalier et Lechevalier, 1979) qui est probablement du 2-O-méthyle-D-mannose (Mort et Lalonde, 1981).

Baker et al. (1981a) ont déterminé 10 critères qui pourraient aider à définir certains isolats donnés comme de souche Frankia. Ces critères sont les suivants: (1) croissance lente (jusqu'à huit semaines avant l'apparition de colonies visibles); 2) micro-aérophile à aérobie; 3) hyphes cloisonnés; 4) sporanges végétatifs et spores non mobiles; 5) pigmentation occasionnelle; 6) capacité à fixer l'azote par des vésicules spécialisées; 7) caractère gram positif; 8) présence d'une enveloppe multilamellaire extérieure à la paroi cellulaire; 9) présence de méso-DAP; et 10) réaction croisée avec le sérum anti-Frankia.

2,4,3 Caractérisation des isolats à l'aide de l'analyse des sucres

Il est difficile de caractériser des isolats même si des lignes directrices ont été proposées pour le faire (Baker et al., 1981a). Les critères les plus pratiques sont la morphologie et l'infectivité sur une plante hôte compatible (Lechevalier et Lechevalier, 1979), mais cette méthode seule semble insuffisante pour différencier des souches étroitement apparentées. D'autres critères, tels que la capacité à sporuler, devraient être utilisés. Cette question sera abordée plus loin dans ce rapport.

Les sucres ont diverses fonctions dans les cellules; entre autres fonctions, ils agissent comme des réserves d'énergie et pénètrent dans des structures telles que les parois cellulaires (Brock, 1974). Certains de ces sucres, comme le glucose, sont très communs dans de nombreux micro-organismes et, par conséquent, ne sont pas très utiles pour la taxonomie. Par ailleurs, il existe des sucres, tels que le madurose (3-O-méthyl-D-galactose) que l'on ne trouve que dans certains genres actinomycétiques comme Actinomadura (Lechevalier et Gerber, 1970) et qui, par conséquent, sont très utiles pour la classification et l'identification des souches. La paroi cellulaire bactérienne est composée, en plus des sucres, d'hexosamines et d'acides aminés (Brock, 1974). L'identité de ces divers constituants est utilisée pour déterminer les types de parois cellulaires, notamment chez les actinomycètes. Les souches Frankia, comme nous l'avons déjà mentionné, ont des parois cellulaires

de type III. Ces critères semblent valides en général, mais ne sont pas très pratiques lorsqu'il faut définir des centaines d'isolats. Toutefois, la présence d'un sucre unique à tous les isolats Frankia, conjointement au test d'infectivité et à la présence des caractéristiques morphologiques déjà mentionnées, pourrait être utilisée pour caractériser de façon positive un isolat comme appartenant à la souche Frankia.

Les hydrates de carbone ou les sucres forment une famille complexe de divers composés organiques, allant de la tétrose à quatre carbones jusqu'aux polymères composés de centaines de milliers d'unités (Morrison et Boyd, 1973). Comme ils sont présents dans tous les micro-organismes (Brock, 1974), les sucres pourraient être utilisés dans leur taxonomie (Lechevalier et Lechevalier, 1970) en gros de la même façon que l'ADN (Okanishi et Okami, 1976), les protéines (Kersters, 1970) ou les métabolites secondaires, tels que les antibiotiques ou les terpènes (Turner, 1973).

Mort et Lalonde (1981) ont trouvé dans les hydrolysats de cellules entières de Frankia un sucre qui n'avait jamais été signalé auparavant dans aucun autre micro-organisme. Ce sucre a été identifié par chromatographie gazeuse des acétates alditol et des dérivés du triméthylsyle et par spectométrie de masse, comme étant du 2-O-méthyl-D-mannose. Ce sucre a été trouvé dans toutes les souches Frankia testées et pourrait ainsi être utilisé comme sucre marqueur. Il existe également un spectre du sucre caractéristique du genre Frankia - des souches qui sont morphologiquement très différentes. $ACNI^{AG}$ et EANIpec, par exemple, contiennent toutes deux les huit sucres suivants: rhamnose, ribose, xylose, 2-O-méthyl-D-mannose, mannose, galactose, glucose et inositol (Lalonde et Mort, communication personnelle). Dans la présente étude, nous avons décidé d'utiliser le spectre du sucre pour confirmer l'identification des isolats Frankia présentant des caractéristiques morphologiques atypiques telles que ACN8, ARgN22, SCN9a et SCN10a. Il a également été nécessaire par la suite de déterminer si 2-O-méthyl-D-mannose était associé à la paroi cellulaire et de vérifier s'il était absent des autres genres d'actinomycètes afin d'en confirmer l'utilité comme instrument d'identification des isolats Frankia.

2,5 Évaluation des isolats Frankia

L'évaluation des isolats pourrait comprendre la détermination de la capacité à métaboliser les sucres ou les acides aminés, la résistance aux métaux lourds, la définition des conditions optimales pour la fixation de N et la croissance. Comme l'objectif immédiat du programme d'isolement est d'améliorer la symbiose pour la fixation de l'azote, l'évaluation porte ici précisément sur la capacité des isolats à fixer l'azote et à permettre la croissance de la plante hôte. Une telle évaluation a ainsi une pertinence directe pour la détermination de la souche qui doit être utilisée dans l'inoculation intensive pour le reboisement d'Alnus crispa et A. rugosa ou de toute autre espèce dans des secteurs perturbés. Les systèmes fixateurs de l'azote sont d'habitude évalués à l'aide de l'essai de réduction à l'acétylène, de l'essai $^{15}N_2$ ou d'un bio-essai (production de la biomasse en l'absence de N).

2,5,1 Essai de réduction à l'acétylène

Van Dijk (1978) a tenté de différencier les souches Sp^+ et Sp^- à l'aide de l'essai de réduction à l'acétylène, mais n'a trouvé aucune différence

statistiquement valide. Il faut souligner que cet essai est une mesure à court terme d'un paramètre qui fluctue au cours de la journée (Wheeler, 1969) de même qu'au cours de l'année (Pizelle et Thierry, 1977) selon la température (Waughman, 1972) et le pO_2 (Fessenden et al., 1973). Par conséquent, les variations sont élevées même entre clones (Dawson et Gordon, 1979).

2,5,2 Essais de $^{15}N_2$

La mesure de la fixation de $^{15}N_2$ est plus complexe que la précédente. Elle présente également l'inconvénient de dépendre du temps et d'être coûteuse (Bergersen, 1980).

2,5,3 Production de biomasse en l'absence de N

Récemment, Dawson et Sun (1981), ainsi que McLean (1981) ont utilisé l'essai de réduction à l'acétylène et différents paramètres de croissance en l'absence d'azote pour évaluer l'efficacité de la fixation de l'azote des plantes actinorhizes. Dawson et Sun (1981) ont trouvé que l'essai de la biomasse (augmentation de la hauteur et du diamètre) des semis cultivés en l'absence totale d'azote fixé était préférable à la seule vérification du poids et du nombre de nodosités pour vérifier la capacité de certaines souches Frankia dans la symbiose avec trois espèces d'Alnus. Les résultats qu'ils ont obtenus avec l'essai à l'acétylène ont été encore moins satisfaisants. McLean (1981), qui travaillait avec Shepherdia canadensis, a établi que la mesure de la tige de la racine et de l'azote total étaient les meilleurs indicateurs de la nodulation et du statut de l'azote des plantes.

Maynard (1980) a utilisé des souches Frankia de quatre origines différentes sous forme de nodosités broyées pour inoculer des semis d'Alnus glutinosa. Après quelques mois de croissance en l'absence totale d'azote fixé, les plants ont été évalués à l'aide de l'essai de réduction à l'acétylène et de l'essai de la biomasse totale. Ce dernier essai a permis à Maynard de mettre en lumière les différences considérables d'efficacité selon que les souches étaient Sp^+ ou Sp^-. À l'essai à l'acétylène, ces différences n'étaient pas significatives au niveau 0,05.

2,6 Stérilisants pour la germination axénique d'Alnus crispa

Du fait de la capacité des aulnes (Alnus spp.) à fixer l'azote en symbiose avec Frankia, on envisage aujourd'hui de les utiliser pour la production de biomasse comme agents intermédiaires dans les rotations des cultures et comme arbres abris (Tarrant et Trappe, 1971). Les études sur les actinorhizes nécessitent actuellement l'utilisation de semis de plantes hôtes axéniques. Récemment, Knowlton et al. (1979) ont fait l'hypothèse que certaines bactéries <<favorisaient>> le processus d'infection des racines par l'espèce Frankia, entraînant le bouclage et le repli des poils des racines au point de pénétration par l'endophyte. Pour vérifier cette hypothèse, il est d'abord nécessaire de trouver la meilleure méthode de stérilisation de surface. Il est également apparu que la présence de champignons et de bactéries avait un effet négatif sur la croissance initiale des semis d'Alnus crispa (Ait.) Pursh. (communication personnelle) utilisés dans les essais d'efficacité (Lalonde et Calvert, 1979) et d'infectivité (Lalonde, 1979a).

Diverses méthodes ont été utilisées pour la stérilisation de surface des graines d'aulne. Pour A. glutinosa, Becking et al. (1974), Rodriguez-Barrueco (1968), Skeffington et Stewart (1976) et Lalonde (1979c) ont utilisé de l'hypochlorite de sodium ou de calcium à des concentrations variant entre 2 et 5,25 % pendant 10 à 45 minutes. Toujours pour A. glutinosa, Quispel (1954), Angulo Carmona (1974), Van Dijk et Merkus (1976), ainsi que Lalonde et Quispel (1977) ont utilisé 0,1 % de brome pendant des périodes variant de 5 à 15 minutes. Pour A. crispa (Ait.) Pursh, Lalonde et Fortin (1972) ont utilisé 5,25 % d'hypochlorite de sodium pendant 45 minutes et, plus récemment, Jobidon et Thibault (1980) ont proposé des traitements de 10 à 15 minutes avec 1 % de merthiolate. Enfin, Neal et al. (1967) ont recommandé de traiter les graines d'A. rubra avec 30 % de H_2O_2 pour une période allant de 30 secondes à 30 minutes. Aucun de ces auteurs n'a toutefois justifié l'utilisation de sa méthode de préférence à d'autres. En d'autres mots, aucun n'a jusqu'à maintenant comparé l'efficacité des différents stérilisants.

Des résultats erratiques ont souvent été obtenus avec l'hypochlorite de sodium (NaCℓO) dans notre laboratoire. Dans certains cas, la plupart des graines ont germé, mais étaient contaminées. Pour des périodes de traitement plus longues, nous avons obtenu une stérilisation de surface, mais les semences n'ont pas germé ou les semis étaient mal formés. Par conséquent, une comparaison rigoureuse a été faite des différents stérilisants de surface appliqués pendant des périodes diverses sur des semences d'A. crispa.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3,1 Isolement des souches

Les nodosités à partir desquelles on a isolé les souches ont été obtenues comme suit:

1. Plantes cultivées en serre, à partir de semences stérilisées en surface, plantées dans la Turface (International Minerals and Chemical Corp., Des Plaines, III.), fertilisées avec une solution Crone exempte de N (Lalonde et Calvert, 1979) et inoculées avec des sols provenant du terrain.
2. Plantes déracinées du terrain, transplantées dans des pots contenant de la Turface et gardées en serre.
3. Nodosités prélevées directement de grappes de nodosités extraites in situ et traitées moins de quelques heures plus tard.

3,1,1 Stérilisation de surface

Les lobes des nodosités ont été lavés à l'eau, séchés avec du papier buvard et immergés dans une solution aqueuse à 3 % pds/vol. de OsO_4 pour des périodes variant de 5 secondes à 6 minutes (Lalonde et al., 1981). Après trois rinçages successifs dans de l'eau distillée stérile et une incubation de 5 à 15 minutes dans des solutions stériles de PVP-PBS (de 0,1 % de PVP pour A. crispa, A. viridis, M. gale et S. canadensis et de 3 % de pds/vol. pour A. rugosa, A. glutinosa et A. serrulata), les lobes individuels ont été broyés dans une nouvelle solution stérile de PVP-PBS et transférés dans des éprouvettes de 20 x 150 mm contenant 14 mL de milieu Qmod B (Lalonde et Calvert, 1979) qui comprenait déjà 5 mg L^{-1} de L-α-lécithine. Normalement, 50 éprouvettes étaient utilisées pour les nodosités de chaque origine et toutes étaient incubées à 27°C.

À l'apparition d'excroissances duveteuses blanchâtres à la surface noircie des nodosités, l'observation à l'oeil nu des éprouvettes et l'observation microscopique à l'aide d'un objectif 100X (microscope à contraste de phases ou microscope interférent) ont permis d'identifier hypothétiquement les isolats comme Frankia (Lalonde et al., 1981).

3,1,2 Sous-cultures des isolats

Dix éprouvettes contenant des isolats supposément purs de Frankia ont été choisies au hasard, scellées avec un bouchon de caoutchouc pour bouteille à sérum, et les colonies ont été brisées à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (20 G). Pour la première sous-culture, quatre nouvelles éprouvettes Qmod B ont été inoculées. Le facteur de dilution, faible au début, pouvait être augmenté de 1 jusqu'à 50 ou plus à la deuxième sous-culture dans le cas des isolats Sp^-. Pour certains Sp^+ d'Alnus rugosa, A. glutinosa et A. serrulata, une sous-culture un pour un a dû être utilisée. La méthode de la gélose en couche supérieure de Quispel et Burggraaf (1981) a été essayée pour la sous-culture d'isolat Sp^- d'A. rugosa, A. glutinosa et A. serrulata: une couche inférieure de gélose à 1 % pds/vol. contenant le milieu Qmod sans peptone a été recouverte d'une couche de gélose à 0,8 % pds/vol. contenant des peptones et 5 mg L^{-1} de lécithine refroidie à 40°C et inoculée avec les colonies fragmentées des isolats supposés de Frankia. Les plaques de Petri ont été scellées et incubées à 27°C. Des plaques SMA (Standard Methods Agar,

BBL) et des tubes Qmod B additionnés de 7 % vol./vol. FBS, dont le but était d'inhiber la sporulation (Lalonde et Calvert, 1979), ont également été utilisés pour la sous-culture d'isolats Frankia Sp^+. La méthode de Perradin (communication personnelle) a été utilisée pour certaines souches Sp^+. Cette méthode comporte l'utilisation d'éprouvettes Qmod B additionnées d'acide benzoïque jusqu'à une concentration finale de 10^{-3} M.

3,1,3 Essais d'infectivité

Des essais d'infectivité en sacs de croissance ont été effectués conformément à Lalonde (1979b). Les semences d'A. glutinosa ont été stérilisées en surface par agitation mécanique dans 30 % de H_2O_2 additionnées d'une trace de Tween 20 (Sigma) comme surfactant pendant 20 minutes. De 5 à 10 graines ont été placées dans la trémie de chacune des poches de croissance auxquelles on avait ajouté 15 mL de solution Crone exempte de N. Les sacs ont été placés dans des chambres de croissance à 15 000 lux pendant 16 heures, à 22°C/17°C (jour/nuit) pour la germination et la croissance. Les semis ont été inoculés après émergence des poils des racines en plaçant, sur les racines, une goutte d'isolat Frankia lavé dans une solution saline tamponnée au phosphate et fragmentée. Les sacs ont été fertilisés bimensuellement avec 1 à 10 mL de solution Crone exempte de N.

3,1,4 Essais de réduction à l'acétylène

Les semis d'A. glutinosa âgés de trois mois et provenant des essais d'infectivité en sacs de croissance ont été analysés pour leur réduction à l'acétylène et leur production d'éthylène selon Koch et Evans (1966). Environ 0,1 g de nodosités, en poids frais, a été extrait et introduit dans des tubes d'essai en verre de 20 x 150 mm, scellés avec des bouchons de caoutchouc pour bouteille à sérum. Dix pour cent de l'atmosphère ont ensuite été remplacés par de l'acétylène et les tubes ont été incubés pendant une heure à la température de la pièce. Des tubes de contrôle sans C_2H_2 ont également été testés. À l'aide d'une seringue de verre étanche au gaz, un échantillon de 25 µL a été injecté dans un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett-Packard, modèle HP5710-A), équipé avec un DFI et une colonne de 180 cm x 1 mm diam. int. remplie de Porapak N de maille 80-100. Les températures à l'orifice d'injection, dans la colonne et dans le détecteur étaient respectivement de 100, 60 et 120°C et les vitesses d'écoulement de H_2, de l'air et du gaz porteur N_2 étaient respectivement de 20, 200 et 30 mL mm^{-1}.

3,1,5 Lyophilisation

Les colonies âgées de 3 à 5 semaines ont été transférées avec environ 0,5 mL du milieu Qmod B original dans deux ampoules rayées de 2 mL (Wheaton Scientific, Millville, NJ). Ces ampoules ont été congelées à - 85°C, dessiquées dans un dessicateur Virtis pendant 3 heures et scellées sous vide. La validité de cette technique a été vérifiée par la sous-culture d'échantillons des cellules Frankia lyophilisées dans des éprouvettes contenant un nouveau milieu Qmod B.

3,2 Caractérisation des souches

Les actinomycètes testés provenaient de trois sources. Les souches de Nocardia asteroides, Streptomyces griseus et Actinoplanes philippinensis ont

été obtenues de l'American Type Cultures Collection (Rockville, Md) et portaient respectivement les numéros 19247, 23345 et 12427. La souche de Streptomyces venezuelae a été gracieusement fournie par le D^r Colin Stuttard (Ecole de médecine de l'Université Dalhousie, Halifax (N.-É.)). Toutes les souches Frankia testées ont été isolées à notre laboratoire. Tous les actinomycètes testés ont été cultivés dans un milieu Qmod B.

3,2,1 Localisation des sucres

Pour localiser les sucres des cellules Frankia (en d'autres mots, pour définir si ces sucres sont cytoplasmiques ou se trouvent dans les parois), des grappes de colonies de l'isolat Ar_gP5^{AG} ont été broyées par un double passage dans une presse French et filtrées sur des membranes de 0,22 µm. Les deux fractions ont ensuite été séchées sous un flux d'air et testées par chromatographie de leurs dérivés d'acétate alditol.

3,2,2 Dérivés de l'acétate alditol

L'analyse des sucres a été effectuée selon la procédure de Mort et Lalonde (communication personnelle). Les grappes de colonies de Frankia d'un tube de milieu Qmod B ont été recueillies à l'aide de pipettes Pasteur, lavées dans le PBS et centrifugées trois fois. Quelques gouttes d'acide acétique à 10 % vol./vol. y ont été ajoutées afin d'éliminer le $CaCO_3$ qui se trouve dans le milieu Qmod B. Les colonies ont ensuite été transférées dans des flacons à réaction de 1 mL (Wheaton Scientific, Millville, NJ) auxquels on a ajouté 0,5 mL d'acide 2N trifluoroacétique (TFA). Les flacons ont été scellés et chauffés à 121°C pendant 60 minutes, puis laissés à refroidir à la température de la pièce. Le TFA a ensuite été évaporé dans un courant d'air dans un bain d'eau à 40°C. Cinquante µL d'une solution fraîche de 20 mg/mL de borohydrure de potassium dans NH_4OH 3M ont été ajoutés aux flacons afin de réduire les hydrolysats. Lorsque la réaction faisait trop de bulles, 25 µL de la solution de borohydrure de potassium ont été ajoutés afin de neutraliser le TFA restant. On a ainsi laissé la réaction se poursuivre pendant une heure à la température de la pièce. Quelques gouttes d'acide acétique glacial y ont ensuite été ajoutées pour mettre fin à la réaction.

Ensuite, 500 µL de méthanol ont été ajoutés en vue de co-évaporer avec le borohydrure dans un courant d'aire dans un bain d'eau à 40°C. La co-évaporation avec le méthanol a été répétée cinq fois ou jusqu'à ce que le résidu prenne un aspect givré plutôt que transparent. Les sucres réduits ont été acétylés par ajout de 50 µL d'anhydride acétique et de 50 µL de pyridine (auparavant séché sur des boules de KOH) et par réchauffement jusqu'à 100°C pendant 15 minutes. Les flacons ont été refroidis et leur contenu évaporé jusqu'à sécheresse. Lorsque ce processus prenait trop de temps, on ajoutait à l'ensemble 100 µL d'acétate d'éthyle (maintenu sur un tamis moléculaire rayé non teinté 5A). Cent µL d'acétate d'éthyle ont effectivement été ajoutés puis évaporés. Ensuite, 10 à 20 µL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés et 1 à 3 µL ont été injectés dans un chromatographe gaz-liquide HP 5830A équipé d'une colonne de verre de 180 cm de longueur sur 2 mm de diamètre intérieur remplie de Gas Chrom Q garni de OV-275 à 0,3 % et de XF-1150 à 0,4 % (ou uniquement de OV-275 à 3 %). Le programme de température était le suivant: 140°C pendant 4 minutes, puis augmentation graduelle de la température de 1°C min^{-1} jusqu'à 180°C. Les températures de l'injecteur et du détecteur DFI étaient de 200°C

et la vitesse d'écoulement du gaz pour H_2, l'air et le gaz porteur N_2 étaient respectivement de 20, 300 et de 28 mL min^{-1}.

3,2,3 Dérivés du triméthylsilyl

Quelques souches ont également fait l'objet d'essais pour déterminer leurs sucres à partir des dérivés du triméthylsilyl (Lalonde et Mort, communication personnelle). Les cellules ont été lavées et hydrolysées avec du TFA, comme précédemment. Ensuite, 25 µL d'une solution de tri-Sil(R) (Pierce Chem. Co., Rockford, III.) ont été ajoutés aux flacons en agitant doucement. Après 1 heure à la température de la pièce, 0,5 5 µL ont été injectés dans un chromatographe gaz-liquide HP 5700 équipé d'une colonne de verre de 180 cm de longueur sur 2 mm de diamètre interne rempli de Chromosorb-W garni de SE-52 à 3 %. Le programme de température était le suivant: température initiale 140°C pendant 32 minutes, puis 8°C min^{-1} jusqu'à 240°C. Les températures de l'injecteur et du détecteur DFI étaient de 250°C et les vitesses d'écoulement de l'air, de l'hydrogène et du gaz porteur hélium étaient respectivement de 240, 22 et 22,5 mL min^{-1}.

3,3 Évaluation des souches

Un sous-échantillon des souches isolées au cours de la première partie de cette recherche a été testé en vue de déterminer son efficacité à fixer l'azote dans des conditions optimales. Aucun autre critère que la disponibilité des cultures n'a été choisi. Les tests d'efficacité dans des blocs de styromousse ont été faits selon la procédure de Lalonde et Calvert (1979). Les graines d'A. crispa provenant de Val d'Or (Québec) (78°O, 48°N) ont été macérées dans de l'eau à 2°C pendant 3 à 4 jours et stérilisées en surface (voir section 3,4). Ces graines ont ensuite été placées, 4 ou 5 à la fois, dans les cavités remplies de Turface et de blocs de styromousse n° 8 (Mansonville Plastics, Montréal) précédemment fertilisés avec une solution Crone exempte de N, et ont germé dans des sacs de plastique transparent dans les mêmes conditions de croissance en chambre que les graines ayant servi aux tests d'infectivité en sacs de croissance.

Après 1 mois, les pousses privées de N ont été éclaircies, placées chacune dans une cavité et inoculées avec une colonie de Frankia âgée de 1 mois, à une densité d'un tube pour 15 cavités. Les isolats ont été lavés dans le PBS et fragmentés avec une aiguille 20G de 2,5 cm et une seringue de plastique de 3 mL. Cinq pousses témoins non inoculées ont été gardées pour chaque isolat testé.

Après environ trois mois de croissance, la hauteur, le poids frais, le poids sec et la teneur en N (micro Kjeldahl) des pousses (Coles et Parks, 1946) ont été mesurés.

3,4 Évaluation des stérilisants

Les graines d'A. crispa ont été gardées à 2°C dans l'obscurité pendant 8 à 10 mois. Les graines vides ont été extraites par flottation dans un mélange d'hexanes (densité 0,662) (Wang, communication personnelle) avant d'être stratifiées dans l'eau déionisée à 2°C pendant 5 jours. Les graines ont ensuite été drainées, rincées avec de l'eau déionisée et stérilisées en surface avec l'un des agents suivants:

1) Un agent de blanchiment commercial (150 mL de NaCℓO à 5,25 % pds/vol.) a été versé dans un Erlenmeyer de 500 mL avec 2 gouttes de Tween 20 (Sigma) dilué à 10 pour 1. Environ 300 graines ont été placées dans le flacon et agitées mécaniquement pour des périodes différentes.

2) Les traitements au peroxyde d'hydrogène, au brome et à l'éthanol étaient identiques au traitement au NaCℓO, sauf que l'on a utilisé du peroxyde d'hydrogène à 30 % vol./vol., du brome à 0,1 % vol./vol. et de l'éthanol à 75 % vol./vol. Du merthiolate à 1 % pds/vol. (Thimerosal, Sigma) a été utilisé sans addition de surfactant de la même façon que le NaCℓO. Environ 300 graines ont été placées dans un infusoir à thé et immergées dans une plaque de Petri contenant une solution aqueuse de OsO_4 à 1 % pds/vol. pour les durées désirées.

Les graines ont été égouttées après tous les traitements et rincées avec 2 L d'eau distillée stérile versée lentement sur elles. Elles ont ensuite été placées à raison de 10 par plaque sur des plaques de numération à la gélose (DIFCO) ou à la gélose sucrose à 1,5 % pds/vol. Les plaques de Petri ont été scellées à l'aide de ruban adhésif et les graines ont été laissées à germer à la température de la pièce (24-26°C) sous une lumière diffuse. Les graines ont été examinées après 5 jours à l'aide d'un microscope stéréoscopique (30X) et le nombre de semis germés axéniques (expérience n° 1) ou de semis normaux axéniques (expérience n° 2) a été relevé. Une germination témoin sur sable de quartz a donné 95 % de semis germés.

4. RÉSULTATS

4,1 Isolement des souches

En moins de 1 an, 250 isolats provenant d'Alnus spp., M. gale et S. canadensis de 33 origines différentes ont été obtenus (tableau 5). Beaucoup d'entre eux proviennent du Québec, le long de la voie maritime du Saint-Laurent, tel qu'illustré à la figure 1. Après un traitement au OsO_4, une excroissance blanchâtre est apparue sur l'épiderme noirci de la nodosité après une moyenne de deux semaines pour les souches de type Sp^- et de quatre semaines pour les souches de type Sp^+. Dans le cas d'A. rugosa, A. serrulata, A. viridis et A. glutinosa Sp^+, cette adaptation pouvait être beaucoup plus lente et les isolats ne se sont jamais entièrement adaptés à leur nouvelle condition de croissance in vitro. Beaucoup des 50 éprouvettes inoculées avec des lobes de nodosités broyés provenant d'un endroit ont été contaminées par les bactéries, la levure ou les champignons. Parmi les éprouvettes non contaminées qui restaient, de 0 à 100% (pour une moyenne de 80% ou de 30 éprouvettes) contenaient supposément des isolats Frankia. Cette identification était basée sur l'observation à l'aide d'un microscope interférentiel des caractéristiques typiques de Frankia, soit la présence d'hyphes cloisonnés, de sporanges contenant des spores non mobiles et de vésicules pédonculées sphériques.

4,1,1 Sous-culture et croissance

Un mois après le traitement au OsO_4 des actinorhizes Sp^-, les éprouvettes scellées ont été soumises à une sous-culture à raison d'un rapport de dilution de 1 pour 4 (c'est-à-dire que l'éprouvette originale a été répartie dans 4 nouvelles éprouvettes). À la seconde sous-culture, une accélération de la vitesse de croissance couplée à une adaptation de l'isolat à ses nouvelles conditions de croissance in vitro, qui l'ont fait passer de sa condition endophytique antérieure à sa condition actuelle d'organisme qui vit librement, ont donné en 10 jours des grappes de colonie prêtes à subir des tests d'infectivité, d'efficacité et de détermination des sucres. Dans le cas de certains isolats de type Sp^- (ACN8, SNC10) et de tous les isolats de type Sp^+, la période nécessaire à l'apparition d'une excroissance assez importante pour la sous-culture était de 2 mois ou plus et le rapport de dilution a dû être réduit à 1 pour 2.

Même alors, dans le cas de certains isolats (ARgP12, ARgP18, ASP4 et AGP8), la croissance n'a pas repris et les isolats sont demeurés en dormance. À l'aide de la méthode à double couche de gélose, nous avons pu obtenir une croissance lente des isolats ASP4; cela n'a toutefois pas été le cas avec les autres isolats de type Sp^+ (ARgP12, ARgP18 et AGP8). À l'aide de tubes Qmod à supplément de FBS, nous avons pu obtenir une croissance très lente pour ARgP18a, AGP8 et ARgP6 (colonies visibles après trois mois). Les tubes Qmod B à supplément d'acide benzoïque ont donné une très bonne croissance pour l'isolat AVP3n avec certains changements morphologiques (densité de la colonie de beaucoup réduite, comme celle des Sp^-, très nombreux petits sporanges sphériques (5-15 µm) au lieu de sporanges moins gros, moins nombreux et moins sphériques associés à AVP3n cultivés dans les tubes Qmod).

Tableau 5. Liste des origines

Acronyme	Lettres des isolats	Lieu d'origine	Type de sol	Type de site	Coordonnées lat.N	Coordonnées long.O	Source
A. crispa							
ACN3	a,b,...,j	Tadoussac	SS	W	48°10'	69°40'	PY
ACN4	b,c,...,j	Cap-aux-Oies	SL	RS	47°30'	70°15'	ML
ACN5	a,b,...,j	Lac Beauport	SS	RS	47°00'	71°15'	col.
ACN6	a,b,...,j	Gaspé	SS	RS	48°55'	64°35'	col.
ACN7	a,b,...,j	Percé	SL	DA	48°30'	64°10'	col.
ACN8	a,b,c,d	Baie St-Paul	SS	RS	47°25'	70°30'	col.
ACN10	a,b,...,t	Tadoussac	SS	W	48°10'	69°40'	YP
ACN11	a,b,...,s,u	Baie St-Paul	SS	RS	47°25'	70°30'	col.
ACN12		Petite-Rivière	SS	RS	47°20'	70°35'	col.
ACN13	a,b,...,j	"	SS	RS	47°20'	70°35'	col.
ACN14	a,b,...,j	Tadoussac	SS	W	48°10'	69°40'	col.
TN15^{AC}	a,b,...,e	Ste-Monique	SS	RS	48°45'	70°50'	ML
ACP17	a,b,...,j	Breakeyville	CL	DD	46°40'	71°15'	col.
TN18^{AC}	a,b,...,h	Manitounuk	SS	W	55°40'	77°25'	AF
ACN20	a,b,...,j	Ste-Louise-des-aulnaies	SS	RS	47°15'	70°05'	col.
ACN21	a,b,...,j	Port-au-persil	SS	RS	47°50'	69°50'	YP
A. rugosa							
ARgN4	a,b,...,j	Pointe-à la-garde	SS	DA	48°05'	67°25'	LS
ARgP5^{AG}		Quebec city	SL	RS	46°45'	71°25'	col.
ARgP6	a,b,c,d	Tadoussac	CL	DD	48°10'	69°40'	col.
ARgN8	a,b,...,j	Sherbrooke	CL	DD	45°25'	71°55'	col.
ARgN9	a,b,...,e	St-Calixte	CL	RS	45°55'	73°50'	YP
ARgP12	a,b	St-Samuel	SS	RS	46°05'	72°15'	ML
ARgN14	a,b,...,j	St-Pierre	CL	W	46°15'	71°35'	ML
ARgN/P18	a-c(P) d-f(N)	Grand-Mère	SS	DA	46°35'	72°40'	ML
ARgN22	a,b,...,j	St-Magloire	SS	RS	46°35'	70°15'	ML
ARgN25	a,b,...,j	St-Omer	SS	RS	47°05'	69°40'	ML
ARgN30	a,b,c	Albanel	CL	DD	48°50'	72°20'	JD
A. viridis							
AVP3	a,b,p	Col du corbier (Alpes)	SS	RS	46°	4°(E)	AM
A. serrulata							
ASP4	a,b,...,e	Gainesville Fl. É.-U.	CL	DD	29°	83°(O)	RJ

Tableau 5. Liste des origines (suite)

A. glutinosa							
AGP8	a,b,c,d	Vallée de l'orge (Paris)	CL	DD	49°	2°(E)	JM
M. gale							
MGP10	a,b,...,j	Cap-aux-Oies	CL	W	47°30'	70°15'	ML
S. canadensis							
SCN9	a	Percé	SL	DA	48°30'	64°10'	col.
SCN10	a	Cap-aux-Oies	CL	W	47°30'	70°15'	ML

Le système d'acronymes est expliqué dans l'annexe A. Les lettres de l'isolat donnent le nombre d'isolats pour chaque lieu d'origine; dans le cas de ARgN18, les isolats Sp^+ sont a, b, c et les isolats Sp^-, d, e, f. Le type de sol a été déterminé à la main (SS: sol sableux; SL: sol loameux; CA: loam argileux). Les types de sites sont des bordures de routes (RS), les secteurs sauvages (W), les secteurs perturbés (DA) et les fossés de drainage ou les berges de rivières (DD). Les sources sont P. Younger (PY), le D^r M. Lalonde (ML), Y. Perradin (YP), le D^r J.-A. Fortin (AF), L. St-Laurent (LS), le D^r J. Dawson (JD), le D^r A. Moiroud (AM), R. Jobidon (RJ) et le D^r J. Mugnier (JM).

Dans les tubes normalisés Qmod B, les isolats ACP17, ACN8 et MGP10 affichaient une vitesse de croissance intermédiaire entre les vitesses rapides des isolats de type Sp^- et très lente des isolats de type Sp^+.

Les isolats ARgP6b et ARgP6d, par exemple, ont donné des colonies deux mois après isolement. Ces colonies ont été placées en sous-culture dans des tubes normalisés Qmod B avec FBS et ont donné des colonies compactes, peu nombreuses et à croissance lente. Ces colonies ont servi aux tests d'infectivité, d'efficacité et de dosage des sucres, mais une seconde sous-culture n'a pas fonctionné et les isolats ont été considérés en dormance. Les semis d'*A. crispa* qui avaient été inoculés avec les deux isolats ont été traités au OsO_4 et les souches *Frankia* isolées de nouveau ($ARgP6b^{AC}$) n'ont pas vu leur vitesse de croissance augmenter. Cela indique un caractère génétique stable.

Des isolats supposés *Frankia* ont été obtenus de grappes de nodosités de plantes cultivées sur le terrain lesquelles avaient été traitées directement, jusqu'à la tombée des feuilles en novembre. Aucune différence dans le délai nécessaire à l'émergence des colonies de *Frankia* ni dans la vitesse de croissance *in vitro* ou dans la morphologie n'a été relevée entre les isolats de printemps, d'été ou d'automne.

Avec l'isolat $ARgP5^{AG}$ obtenu par la méthode de dilution en série (Lalonde, 1979a), il a fallu deux mois avant qu'apparaissent des grappes de colonies dans le milieu Qmod B (figure 2). Avec le nouvel isolat obtenu par la méthode au OsO_4 à partir de semis d'*A. crispa* en sacs de croissance

(ARgPr$^{\underline{AG}\ AC}$), le temps requis pour l'apparition de grappes de colonies a été réduit à deux semaines (figure 5).

4,1,2 Morphologie des isolats

La morphologie des isolats était, en général, la suivante: formation d'un revêtement blanchâtre au fond du tube; au microscope optique, objectif 100X, présence de petits hyphes (0,5 à 1,0 µm) cloisonnés et ramifiés, de sporanges de formes et de tailles différentes (5-100 µm) contenant des spores non mobiles de 0,2-1,0 µm, et de vésicules pédonculées et cloisonnées occasionnelles (figure 2). Les isolats obtenus à partir des nodosités Sp^+ (figure 3) ont produit des colonies beaucoup plus denses, au point qu'il a fallu en interrompre la croissance avant de les observer au microscope optique. Les isolats de Sp^+ ont également produit des sporanges plus nombreux et plus gros (jusqu'à 150 µm) comparativement aux sporanges des colonies de type Sp^- (20-50 µm) (figure 4). Certains isolats (ACN8 et ARgN22) n'ont pas donné de sporanges normaux, mais seulement de très rares excroissances très petites (5 µm) qui se sont révélées être des sporanges avortés (figure 6).

L'un de ces isolats (ACN8a) a été isolé de nouveau après inoculation sur A. glutinosa (ACN8$^{\underline{AG}}$a) afin de vérifier la stabilité génétique du caractère et aucune augmentation du nombre de sporanges ou de leur taille n'a été notée entre les deux isolats.

Les isolats SCN9a et SCN10a présentaient des caractéristiques morphologiques typiques des isolats d'Elaeagnus (figure 7), c'est-à-dire de nombreuses vésicules, une matrice dense et quelques sporanges de petite taille (3 à 10 µm), mais sans pigmentation, comme cela était le cas de la plupart des autres isolats d'Elaeagnus. Leur vitesse de croissance était aussi remarquablement lente.

4,1,3 Infectivité

Sur les 248 isolats testés, tous étaient infectieux et ont formé des prénodosités dans les 8 à 10 jours qui ont suivi l'inoculation, puis une semaine plus tard, des nodosités qui ont permis à A. glutinosa hôte de croître normalement dans une solution Crone exempte de N. Ces nodosités ont été sectionnées et teintées avec du bleu de coton. Ces sections avaient la même morphologie que les nodosités poussées dans le milieu naturel. Les plantes témoins (non inoculées) étaient rabougries et chlorotiques (figure 8b).

Les isolats SCN10a et SCN9a n'ont fait l'objet d'aucun test d'infectivité à cause des difficultés de les obtenir en sous-culture.

4,1,4 Observation microscopique des sections de nodosités

Dans les sections des nodosités teintés au bleu de coton, nous avons observé des hyphes et des vésicules Frankia qui poussaient dans les cellules mi-corticales. Les hyphes ont envahi des cellules apicales y formant un réseau central et, plus tard, des vésicules se sont développées à la périphérie des cellules. Dans les isolats de certains endroits, nous avons observé des sporanges inter- et intracellulaires (nodosités type Sp^+) (figure 8a).

Les isolats de type Sp^+ de la province de Québec provenaient généralement des basses-terres du Saint-Laurent, colonisées principalement par A. rugosa. Dans les hautes-terres, où A. crispa est dominant, toutes les nodosités d'A. crispa étaient de type Sp^-, et l'A. rugosa hôte, poussant dans son habitat atypique des terres hautes sèches, avaient généralement des nodosités Sp^- (ARgN14, 22, 25) sauf pour certains Sp^+ (ARgP6). Dans la zone d'introgression, qui se trouve dans la vallée au nord du 47° (lat. N) et dans les montagnes au sud du 47° (lat. N), les deux types Sp^+ et Sp^- ont été observés sur les plantes hôtes A. crispa et A. rugosa. À Cap-aux-Oies, où l'on rencontre A. crispa, M. gale et S. canadensis, A. crispa et S. canadensis étaient de type Sp^-, et M. gale de type Sp^+.

4,1,5 Essai de réduction à l'acétylène

Les grappes de nodosités formées par 14 isolats différents choisis au hasard parmi les semis des blocs de styromousse d'A. crispa, ou parmi ceux cultivés dans les sacs de culture d'A. glutinosa (tableau 6), affichaient une production d'éthylène de l'ordre de 0,50 à 15 µmoles C_2H_4 $h^{-1}g^{-1}$ (séché à l'étuve) de nodosités.

4,1,6 Lyophilisation

Tous les isolats obtenus en sous-culture dans les tubes Qmod B ont été lyophilisés en trois exemplaires. Certaines souches telles que $ArgP5^{AG}$, ACN8a, ACN10a, ANC14a, etc., qui présentaient un intérêt particulier, ont été lyophilisées en plus grande quantité. Les isolats Sp^+ à croissance lente, tels que ARgP6, ARgP12 et AGP8, n'ont pas été lyophylisés mais gardés dans des tubes scellés et stockés comme <<cultures liquides>> dans la collection.

4,2 Caractérisation des souches

Tous les isolats identifiés comme Frankia d'après leur morphologie et leur infectivité et ayant subi une détermination de leurs sucres contenaient le sucre 2-O-méthyl-D-mannose. Tous les isolats répertoriés au tableau 7 possédaient un spectre de sucre semblable à celui de la souche $TN15a^{AC}$ (figure 9), comprenant rhamnose, ribose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol, en plus de 2-O-méthyl-D-mannose.

Les hydrolysats de cellule entière de Nocardia asteroides, Actinoplanes philippinensis, Streptomyces griseus et S. venezuelae n'ont pas présenté de pics de 2-O-méthyl-D-mannose (figure 9).

4,2,1 Localisation des sucres

2-O-méthyl-D-mannose n'a pas passé à travers le filtre membrane de 0,22 µm (figure 10) présumément parce qu'il n'était pas soluble. Les proportions relatives des autres sucres ont également changées: ribose, galactose et glucose étaient plus abondants dans le filtrat tandis que mannose, xylose et 2-O-méthyl-D-mannose apparaissaient en quantités plus importantes dans les fractions non solubles.

Tableau 6. Liste des 14 isolats testés comme endophytes pour la réduction à l'acétylène

TN15$\frac{AC}{a}$	ARgP5$\frac{AG}{}$	ARgN14a	ARgN22d
TN15$\frac{AC}{b}$	ARgN8a	ARgN18d	AVP3m
TN15$\frac{AC}{c}$	ARgP12e	ARgN18f	AGP8a
ACP17b			MGP10a

Tableau 7. Liste des souches Frankia testées pour leurs sucres par leurs dérivés d'acétate alditol

ACN3a	ACN11a	TN15a$\frac{AC}{}$	ARgN14a
ACN5a	m	b	b
ACN6a	ACN12	ACP17a	ARgN18d
ACN7a	ACN13a	b	ARgN22a
ACN8a	b	TN18a$\frac{AC}{}$	d
b	c	ACN20b	ARgN25a
c	d	ACN21b	b
d	f	ARgN4a	ARgN30c
ACN10a	ACN14a(*)	ARgP5$\frac{AG}{}$	AVP3d
b	b	ARgP6a	f
c	c	b	m
d	d	ARgN8c	MGP10a
t	e	ARgN9c	SCN9a(*)
			SCN10a(*)

(*) Les souches ont également été testées par dérivation dans le triméthylsilyl.

4,2,2 Dérivés du triméthylsilyl

La chromatographie des dérivés de triméthylsilyl des isolats ACN14a, SCN9a et SCN10a a révélé la présence des mêmes sucres et a confirmé l'identité du pic de 2-O-méthyl-D-mannose tel qu'observé par la chromatographie des dérivés de l'acétate alditol.

4,3 Évaluation des souches

Quarante isolats ont été testés successivement dans des blocs de styromousse. Les paramètres mesurés, la hauteur (tableau 8), le poids frais (tableau 9), le poids sec et la teneur en N, sont apparus bien corréliés (p. ex. R = 0,94 entre les moyennes de la hauteur et de la teneur en N de chaque isolat). Les trois essais ont été effectués dans des conditions de croissance différentes

Tableau 8. Hauteur des semis

Test n° 1			Test n° 2			Test n° 3		
ACN10a	28,1 - 3,3	a	ACN14a	22,1 - 3,2	a	ARgN14a	11,1 - 3,3	bcd
b	27,7 - 4,4	a	b	19,9 - 3,9	ab	b	14,2 - 3,3	a
c	27,0 - 5,1	a	c	23,1 - 4,6	a	ARgN22a	12,9 - 2,5	ab
d	28,0 - 5,3	a	d	21,1 - 4,2	a	d	12,1 - 2,6	abc
ACN11a	34,7 - 3,6	ab	e	21,6 - 3,4	a	ARgN18d	10,1 - 2,0	cde
b	21,9 - 6,6	bcd	ACN13a	19,6 - 4,4	ab	f	12,7 - 3,1	ab
ARgPt$^{AG}_{b}$	23,2 - 5,2	d	b	20,7 - 5,5	a	TN15$_b^{AC}$	12,6 - 2,7	ab
ACN8a	19,0 - 5,1	c	c	20,5 - 4,6	a	d	11,1 - 2,7	bcd
b	21,7 - 4,2	bc	d	20,7 - 2,6	a	ACP17a	9,8 - 2,0	de
c	22,3 - 4,9	bc	f	20,0 - 3,2	ab	b	9,1 - 2,3	de
AVP3d	13,2 - 9,9	cd	ACN12	21,8 - 2,4	a	AVP3m	8,9 - 2,3	e
f	17,4 - 5,2	d	ACN11m	21,1 - 4,6	a	MGP10a	6,3 - 2,6	e
témoin	1,5 - 0,5	c	ACN10t	21,9 - 3,9	a			
			ACN8d	17,5 - 4,5	b			
			ARgP6b	13,9 - 6,1	c			
			d	18,4 - 3,8	b			

Tableau 9. Poids frais des semis

Test n° 1			Test n° 2			Test n° 3		
ACN10a	9,1 - 2,4	a	ACN14a	5,7 - 1,3	a	ARgN14a	1,6 - 0,7	cd
b	6,8 - 2,4	b	b	5,0 - 1,4	ab	b	2,1 - 0,8	abc
c	9,1 - 2,4	a	c	5,7 - 1,6	a	ARgN22a	2,5 - 0,8	ab
d	8,0 - 2,4	ab	d	5,4 - 1,5	a	d	2,2 - 0,8	abc
ACN11a	6,7 - 1,9	b	e	5,0 - 1,9	ab	ARgN18d	1,8 - 0,5	cd
b	4,5 - 1,9	c	ACN13a	4,8 - 1,9	ab	f	2,0 - 0,7	bcd
ARgP5$^{AG}_{b}$	6,4 - 2,2	b	b	4,5 - 2,3	ab	TN15$_b^{AC}$	2,5 - 0,7	a
ACN8a	5,7 - 2,2	bc	c	4,8 - 2,0	ab	d	1,9 - 0,7	cd
b	5,9 - 2,1	bc	d	4,9 - 1,4	ab	ACP17a	1,7 - 0,6	cd
c	5,0 - 2,5	bcd	f	5,3 - 1,4	a	b	1,4 - 0,5	cd
AVP3d	3,2 - 3,7	d	ACN12	4,7 - 1,3	ab	AVP3m	1,3 - 0,5	cd
f	4,3 - 2,2	cd	ACN11m	4,8 - 1,4	ab	MGP10a	1,1 - 0,5	d
témoin	0,3 - 0,2	e	ACN10t	5,1 - 1,6	a			
			ACN8d	3,5 - 1,7	bc			
			ARgP6b	2,3 - 1,9	c			
			d	3,7 - 1,2	bc			

et ont donné des moyennes globales différentes pour chaque paramètre (figure 11). Pour rendre les essais comparables, les données ont été transformées en pourcentage du plus efficace de chacun d'eux, ce qui a donné deux grappes, l'une d'isolats de type Sp^+ et l'autre d'isolats de type Sp^- (figure 12). Sur ces données transformées, un test t de Student sur des pourcentages linéarisés (arcsin $\sqrt{x}$) a été effectué pour les moyennes des teneurs en N et des hauteurs.

Les figures 11 et 12 montrent que les isolats de type Sp^- et Sp^+ affichent des différences significatives au niveau 99 % et que les isolats de type Sp^- ACN8a, b, c et d, ACN11b, ARgN18a, TN15a^{AC} et ARgN14d se sont retrouvés dans la grappe des isolats de type Sp^+. Les variations entre isolats de même origine et entre ceux d'origine différente n'étaient généralement pas significatives, sauf dans le cas de ACN11, ARgP6, ARgN14 et ARgN18 (voir tableaux 8, 9). Les isolats ACN10, ACN8, AVP3, ACN13, ACN14, ARgN22, TN15 et ACP17 n'affichaient aucune différence significative. D'après ces tableaux (8, 9) il apparaît clairement que les souches de type Sp^- (ACN10, ACN14 et ARgN14) étaient toujours plus efficaces que les souches Sp^+ (AVP3, ARgP6 et MGP10).

Les essais d'efficacité ont montré que, généralement, aucune différence significative n'existait entre la hauteur des isolats d'une même origine, sauf pour trois cas d'A. rugosa (ARgP6, ARgN14 et ARgN18). Le poids frais affichait des résultats légèrement différents (différences significatives au niveau 95 % observées chez ACN10, ACN11 et TN15^{AC}, mais non pas avec ARgN14, ARgN18 et ARgP6). Compte tenu du fait que le poids frais est un paramètre beaucoup moins stable que la hauteur, les résultats de ce dernier paramètre ont été préférés.

Les variations selon l'origine étaient significatives dans certains cas, mais la principale source de différences était attribuable au caractère endophytique de type Sp^+ et Sp^- (figure 12). Les inoculants les plus efficaces déterminés grâce au paramètre de la hauteur dans les trois essais étaient de type Sp^- (ACN10, ACN14 et ARgN14a) et les moins efficaces étaient du type Sp^+ AVP3, ARgP6 et MGP10 (figures 13, 14, 15).

4,4 Évaluation des stérilisants de surface

Dans la première expérience, du NaCℓO à 5,25 %, du OsO_4 à 1 %, du H_2O_2 à 30 %, du merthiolate à 1 % et de l'éthanol à 75 % ont été utilisés pour des périodes variant de 5 à 125 min (figure 16a). Les traitements au merthiolate, à l'éthanol et au OsO_4 n'ont pas donné de résultats satisfaisants parce qu'ils n'ont pas donné plus de 65 % de germinants axéniques. Même si le traitement au merthiolate a donné jusqu'à 63 % de semis axéniques après 20 min, un grand nombre des semis présentait des radicelles rabougries. Le NaCℓO s'est révélé efficace, mais nécessitait jusqu'à 80 minutes pour donner plus de 80 % de semis germés axéniques. Pour des périodes de plus de 40 minutes dans le NaCℓO, de forts pourcentages de semis malformés ont été observés. Le peroxyde d'hydrogène a donné plus de 80 % de graines germées stériles et, après 25 minutes, plus de 80 % des graines étaient toujours axéniques et normales.

Les contaminants obtenus sur gélose de sucrose étaient identiques à ceux obtenus sur une plaque de numération à la gélose, sauf que la croissance des

contaminants (champignons et bactéries) y était beaucoup plus rapide. Parfois, cela a complètement empêché la détection de toute germination. La croissance des radicules était également réduite de beaucoup sur la plaque de numération à la gélose; celle-ci n'a pas été utilisée pour l'expérience n° 2.

Dans la deuxième expérience, (figure 16b), on a utilisé du Br à 0,1 %, du NaCℓO à 5,25 % et du H_2O_2 à 30 %. Seuls des semis axéniques ont été observés.

Le brome s'est révélé très efficace, ne nécessitant qu'une courte période de traitement pour obtenir un nombre maximal de semis utilisables. Le temps de traitement était critique, car après 10 minutes, de nombreux semis étaient anormaux. L'hypochlorite de sodium s'est également révélé très efficace, mais nécessitait 30 minutes pour donner plus de 80 % de germinants non déformés axéniques. Le peroxyde d'hydrogène a donné le plus fort pourcentage de semis normaux axéniques et un traitement prolongé jusqu'à 30 min n'affectait pas la croissance des radicules.

Les courbes de H_2O_2 (figures 16a et b) sont comparables, tandis que celles de NaCℓO sont différentes, les valeurs après 30 minutes étant respectivement de 60 et 90 %.

5. DISCUSSION

5,1 Isolement des souches

5,1,1 Morphologie et infectivité

La morphologie des isolats Frankia était semblable à celle décrite par Callaham et al. (1978), Berry et Torrey (1979), Lechevalier et Lechevalier (1979), Baker et Torrey (1979), Burggraaf et al. (1981) et Lalonde et al. (1981), sauf que les vésicules typiques de Frankia décrites par Lalonde et Calvert (1979) ont été observées dans tous les isolats, en plus des hyphes ramifiés et cloisonnés et des sporanges typiques de la souche.

Les isolats obtenus étaient tous infectieux et formaient des nodosités, tels que décrits par Angulo Carmona (1974). La morphologie des nodosités était semblable à celle des nodosités à partir desquelles Frankia avait été isolé, confirmant ainsi les postulats de Koch. D'autres chercheurs n'ont pas toujours réussi leur test de ré-infectivité. Par exemple, les deux isolats Frankia provenant de nodosités de Casuarina décrits par Gauthier et al. (1981) ne se sont pas révélés infectieux sur les semis de Casuarina. Les isolats obtenus par Callaham et al. (1978), Berry et Torrey (1979) et Baker et Torrey (1980) étaient tous infectieux, bien que l'un d'eux provenant d'Elaeagnus ait été définitivement classé comme non infectieux sur la même plante hôte (Baker et al., 1980). Certains isolats définis comme Streptomyces pourraient avoir été des isolats Frankia in vitro non sporulants et non infectieux (Berry et Torrey, 1979). Burggraaf et al. (1981) ont décrit certains de leurs isolats comme non infectieux après des changements marqués dans la vitesse de croissance et les besoins de croissance.

Il se pourrait que certaines techniques d'isolement perturbatrices détruisent la plupart des hyphes Frankia présents dans les nodosités. Cela pourrait non seulement entraîner une prolongation de la période d'adaptation, mais aussi obliger les cellules à passer par un plus grand nombre de divisions que dans la méthode au OsO_4 pour obtenir le nombre minimal de cellules nécessaires à la sous-culture. Une division cellulaire plus prononcée peut accroître la probabilité de mutations telles que celles qui sont à l'origine de la non nodulation (Burggraaf et al., 1981).

La morphologie de l'endophyte nodulaire des plantes hôtes du genre Alnus était similaire à celle décrite par Lalonde et Fortin (1973) et Lalonde et Knowles (1975b). La morphologie de l'endophyte des nodosités de Myrica gale était semblable à celle décrite par Bowse et al. (1977) et Benson et Eveleigh (1979). La morphologie de l'endophyte nodulaire de Shepherdia canadensis était semblable à celle de Hippophaë rhamnoides décrite par Gatner et Gardner (1970).

5,1,2 Distributions Sp^+/Sp^-

La présence de spores et de sporanges (Van Dijk et Merkus, 1976) a été observée dans certaines nodosités d'Alnus et de Myrica spp. Contrairement à Kappel et Wartenberg (1958) et Van Dijk (1978), qui ne pouvaient déceler aucune relation entre la présence ou l'absence de sporanges et les facteurs écologiques, nous avons trouvé un modèle de distribution dans lequel les

endophytes de type Sp^+ étaient principalement associés à A. rugosa dans les basses terres fertiles et ceux du type Sp^-, dans les terres hautes sèches. Par conséquent, selon nous, la situation observée au Québec pourrait jeter une certaine lumière sur l'importance écologique du principe des deux types (Van Dijk, 1978). A. rugosa et A. crispa se retrouvent dans la région de la vallée du Saint-Laurent qui chevauche le nord du 47°N (figure 1). Au sud de cette ligne imaginaire, on rencontre des taches disséminées de semis d'A. crispa, habituellement dans les basses terres humides qui sont l'habitat normal d'A. rugosa. Au nord de cette ligne (figure 1), A. crispa est l'espèce actinorhize dominante, mais A. rugosa survit quand même dans les habitats de hautes terres sèches habituellement dominés par A. rugosa ailleurs. L'essence Alnus évolue en Amérique du Nord depuis la dernière glaciation (Daly, 1966). Selon les données provenant des études polliniques (Richard, 1977) et compte tenu de la présence de populations distinctes variantes d'A. crispa dans le sud des Appalaches (Furlow, 1979), il semble que l'habitat de cette essence ait eu une limite plus méridionale qu'aujourd'hui.

Comme A. crispa est typiquement en symbiose avec les endophytes Sp^-, et A. rugosa avec les endophytes de type Sp^+, il était étonnant de voir que presque tous les plants d'A. rugosa croissant dans des habitats atypiques (terres hautes sèches au nord du 47°) étaient en symbiose avec les souches Frankia de type Sp^-. A. crispa croissant au sud de leur habitat normal abritait principalement des souches Frankia de type Sp^-. Il existe quelques exceptions, telles que ACP17. Le modèle suggère qu'A. rugosa a progressé vers le nord plus rapidement que son symbionte et qu'il a été colonisé par des souches Frankia de type Sp^- atypiques laissées par leur hôte habituel A. crispa.

Le modèle de distribution des types Sp^+ et Sp^- de Frankia pourrait également avoir été causé par une adaptation écologique non seulement aux plantes hôtes A. crispa et A. rugosa, mais également à l'azote du sol (à teneur élevée dans les terres basses humides, à teneur faible dans les terres hautes sèches), au pO_2 du sol, au pH ou à d'autres facteurs. Un tel modèle de distribution des endophytes a également été observé dans Ceanothus velutinus par Wollum et al. (1968), qui ont émis l'hypothèse selon laquelle, par la sélection, deux populations de Frankia présentant des caractéristiques différentes pourraient se développer.

La présence de sporanges dans les nodosités d'autres plantes hôtes à partir desquelles on a effectué des isolements n'a pas fait l'objet de recherche au-delà de la détermination du type particulier de nodosité sur lequel nous avons travaillé.

Les deux semaines nécessaires à l'apparition des supposés isolats Frankia après isolement à la méthode au OsO_4 contrastent avec les deux mois nécessités par les autres méthodes, plus perturbatrices, telles que la dilution en série (pour $ARgP5^{AG}$), la centrifugation de gradients de densité du sucrose (Baker et Torrey, 1979) ou l'incubation sélective (Quispel et Burggraaf, 1981). La méthode d'isolement utilisée dans cette étude a toujours réussi avec les endophytes de type Sp^-. Toutefois, elle a été moins efficace avec les isolats de type Sp^+.

Cela pourrait être attribuable au fait qu'A. rugosa, A. glutinosa et A. serrulata contiennent une plus grande quantité de phénols que les nodosités

d'A. crispa et A. viridis (observation personnelle). Les différences dans les besoins de croissance des types Sp^+ parmi les isolats de différentes plantes hôtes (Burggraaf et al., 1981) pourraient également être responsables de ces retards de croissance. La vitesse de croissance in vitro de ACP17, AVP3 et MGP10 était inférieure à celle des isolats de type Sp^+, mais supérieure à celle des autres isolats de type Sp^+ provenant d'A. rugosa, A. glutinosa et A. serrulata. Cela recoupe l'observation faite par Burggraaf et al. (1981) qui ont trouvé que les isolats de type Sp^+ de Myrica gale avaient de moins grands besoins de croissance que les isolats de Sp^+ d'A. glutinosa.

Le fait que ARgP6b n'a pas affiché une croissance plus rapide après un nouvel isolement d'A. crispa ($ARgP6b^{AC}$) pourrait signifier soit qu'un déterminant génétique est en cause, soit qu'il s'agit d'un caractère phénotypique tout à fait stable. Cela est souvent le cas chez les actinomycètes, dont la morphologie est influencée pendant de nombreuses sous-cultures par l'histoire antérieure de la culture (Waksman, 1959). Après avoir fait jusqu'à 10 isolements de $ACNI^{AC}$, nous n'avons observé aucun changement significatif qui étayerait l'hypothèse du déterminant génétique.

5,1,3 Conditions de croissance

Il apparaît clairement que les conditions de croissance que nous avons utilisées, de même que celles utilisées par la plupart des autres chercheurs, convenaient bien aux isolats des nodosités Sp^-. Les résultats pour les spores Sp^+ étaient variables. Nous avons essayé quelques méthodes différentes telles que la double couche de gélose (Burggraaf et al., 1981), le Qmod B-FBS (Lalonde et Calvert, 1979) ou l'acide Qmod-benzoïque (Perradin, communication personnelle) et avons trouvé que chacune de ces méthodes functionne dans certains cas, mais pas dans tous. Il faudra donc procéder à d'autres essais afin de déterminer les conditions de croissance les mieux adaptées à toutes les Frankia, notamment aux isolats Sp^+. La meilleure approche consiste, de toute évidence, à essayer de reproduire ces conditions dans les nodosités. Certains travaux ont été entrepris récemment à ce sujet (Gardner et al., 1979; Knights et al., 1981; Perrot-Rechenmann et al., 1981). L'apparition d'hyphes et de spores Frankia sur la surface épidermique noircie des nodosités Sp^+ et l'échec des sous-cultures de ces isolats (ARgP6, ARgP12, AGP8) n'ont pas été mentionnés par d'autres auteurs. Cela indique peut-être que tant la composition du milieu que les conditions de croissance ont empêché l'isolement en culture pure de nombreuses souches Frankia.

5,2 Caractérisation des isolats

L'analyse des sucres des isolats de nodosités a démontré la valeur de l'essai visant à confirmer l'identité des souches présumées Frankia d'après la morphologie et l'infectivité sur une plante hôte compatible. La présence des huit sucres typiques (figure 9) a été relevée en proportion similaire dans tous les isolats testés (tableau 7), indépendamment de l'origine de la plante hôte ou du <<type de sporulation>>. Ce fait est un indice de la forte homogénéité structurale qui existe chez le genre Frankia.

Le spectre des sucres donne également des informations importantes sur la structure de la paroi cellulaire (Brock, 1974). C'est dans la paroi cellulaire que l'on retrouve le sucre 2-O-méthyl-D-mannose.

Bien que ce sucre semble caractéristique d'Alnus spp., cela ne doit pas être tenue pour acquis, étant donné que nulle part dans la littérature il est dit qu'on ne l'a pas trouvé dans le spectre des sucres d'autres organismes. L'équipement nécessaire pour identifier un sucre inconnu tel que 2-O-méthyl-D-mannose est coûteux et n'est pas facilement disponible. Il ne vaut pas la peine de l'utiliser seulement pour identifier un pic mineur. L'analyse de l'ensemble du spectre des sucres est plus fiable comme indicateur que l'identification d'un seul pic.

Les dérivés de l'acétate alditol et du triméthylsilyl peuvent tous deux permettrent la détection de huit sucres typiques, mais la simplicité de la préparation des dérivés du triméthylsilyl est compensée par les difficultés associées à la présence de deux pics par sucre. Toutefois, leur utilisation coordonnée est fortement recommandée, notamment en cas de doute, comme cela a été fait pour les isolats SCN9a et SCN10a dont les caractéristiques morphologiques n'étaient pas typiques.

Il est important d'inclure un essai biochimique dans toute étude sur la taxonomie des bactéries afin de confirmer les résultats des essais morphologiques ou physiologiques. L'analyse du spectre des sucres est utile et peut servir à cette fin chez le genre Frankia.

5,3 Évaluation des isolats

L'existence d'une différence significative entre les types Sp^+ et Sp^- a été suggérée par Hall et al. (1979), qui ont utilisé des inocula de nodosités broyées de type Sp^+ et Sp^- sur A. rubra et A. glutinosa. Maynard (1980) a également observé une telle différence entre les inocula de nodosités broyées Sp^+ et Sp^- sur A. glutinosa, de même qu'un effet marqué de l'histoire antérieure de l'efficacité de l'inoculum. Par exemple, la proximité géographique de l'inoculum par rapport à l'hôte a amélioré tous les paramètres mesurés.

Le caractère des types Sp^+ et Sp^- et l'histoire antérieure des isolats serait donc la source de variation la plus importante entre isolats. La différence marquée attribuable aux types Sp^+ et Sp^- et les différences mineures observées entre les isolats d'une même origine et entre les isolats d'origine différente viennent valider notre procédure qui consistait à isoler jusqu'à 10 isolats d'une même origine et d'origines diverses. Cette procédure a été rendu possible par la technique d'isolement au OsO_4 (Lalonde et al., 1981).

Les isolats groupés dans la partie supérieure droite de l'ensemble Sp^- (figure 7) représentent les meilleures souches pour l'inoculation de masse d'A. crispa dans les sols secs pauvres en azote. La conclusion de Maynard (1980) concernant la meilleure efficacité des souches de type Sp^- comparativement aux souches de type Sp^+ recoupe généralement ce que nous avons trouvé; cela signifie qu'en général les isolats de type Sp^- sont préférables à ceux du type Sp^+. Les isolats Sp^+ n'en présentent pas moins un avantage écologique comparativement aux isolats Sp^- et peuvent être préférables lorsqu'il faut assurer un pourcentage élevé et prolongé de survie de l'inoculum ou lorsque la teneur en azote du sol est élevée. Des recherches ultérieures devront être faites afin d'établir la valeur écologique des souches de type Sp^+. La situation au Québec pourrait éclaircir ce sujet.

Le retard de nodulation noté par Lalonde (1977), qui utilisait des inocula de nodosités broyées de différentes espèces d'aulne, n'a pas été observé sauf dans le cas de MGP10a et a donnée une moins bonne efficacité.

Trois objectifs avaient été fixés avant le début du travail dont il est question ici: 1) isolement d'un grand nombre de souches Frankia et caractérisation de ces isolats en fonction de leur morphologie et de leur infectivité; 2) confirmation de l'identité des souches par l'analyse du spectre des sucres contenant, entre autres, 2-O-méthyl-D-mannose; et 3) évaluation de l'efficacité à fixer l'azote d'un sous-échantillon d'isolats en symbiose avec A. crispa.

Deux cent cinquante souches Frankia ont été isolées à partir d'A. crispa, A. rugosa, A. glutinosa, A. viridis, A. serrulata, Myrica gale et Shepherdia canadensis et ont été déposées dans la collection de l'Université Laval (Faculté de foresterie et de géodésie, Dr M. Lalonde).

La méthode d'isolement utilisée était basée sur l'utilisation du OsO_4, un fixatif de microscopie électronique dont l'effet rapide et efficace a simplifié et rendu reproductible l'isolement d'un grand nombre de souches d'origine différente. Le traitement au OsO_4 a aussi permis d'isoler des souches mutantes jamais décrites auparavant dans la littérature, telles que les isolats ACN8 et ARgN22 non sporulants in vitro ainsi que les souches Sp^+ AGP8, ASN4, ARgP12 et ARgP18, qui sont difficiles à isoler et à cultiver à l'aide de méthodes classiques simples (Quispel et Burggraaf, 1981).

Ces souches, qui ont été caractérisées selon leur morphologie, leur infectivité sur une plante hôte compatible et leur taux de croissance in vitro, représentent une bonne partie du spectre naturel des souches Frankia, endophytes d'A. crispa et A. rugosa au Québec. La plupart de ces souches étaient semblables à tout point de vue à CpI1 (Callaham et al., 1978) et AvcI1 (Baker et Torrey, 1980), et certaines souches de type Sp^+ étaient semblables aux isolats obtenus d'A. glutinosa et M. gale (Burggraaf et al., 1981). Quelques isolats bizarres ont été obtenus, qui n'avaient jamais été mentionnés dans la littérature auparavant; on pouvait s'y attendre du fait que les expériences d'isolement dont il est question ici sont probablement les plus exhaustives jamais entreprises.

La caractérisation des isolats de souches Frankia était basée principalement sur la morphologie, critère simple. Ensuite ont été effectués des essais d'infectivité sur des plantes hôtes compatibles, critère utilisé pour des fins de confirmation. En cas de doute, et d'une façon générale, pour établir la valeur du test, une analyse des sucres des hydrolysats de cellules entières des supposés isolats Frankia a été effectuée afin de déceler la présence de huit sucres typiques des cellules Frankia: rhamnose, ribose, xylose, 2-O-méthyl-D-mannose, mannose, galactose, glucose et inositol (Lalonde et Mort, communication personnelle). Le sucre le plus important, mais non le seul pertinent, était 2-O-méthyl-D-mannose, un sucre marqueur de Frankia.

Les trois critères mentionnés ci-dessus forment un ensemble valide, simple et cohérent qui constitue un marqueur viable de souche Frankia.

Une importante homogénéité de l'infectivité et des caractéristiques du spectre des sucres des isolats a été relevée: tous les isolats étaient

infectieux et tous avaient des concentrations semblables des huit sucres mentionnés ci-dessus. Toutefois, les caractéristiques morphologiques et les taux de croissance in vitro variaient, principalement en fonction du type de sporulation auquel les isolats appartenaient (Sp^+ ou Sp^-).

L'efficacité à fixer l'azote d'un sous-échantillon de souches a été testée dans des chambres de croissance en trois essais successifs. Les souches d'une même origine avaient des efficacités généralement similaires, mais les quelques exceptions observées ont validé notre procédure. Celle-ci consistait à isoler et sous-cultiver jusqu'à 10 souches de chaque origine à l'aide de la méthode OsO_4. La source de variation la plus importante dans l'efficacité à fixer l'azote, telle que mesurée par les paramètres de la croissance en l'absence totale d'azote fixée, était la différenciation des isolats en groupes de type Sp^+ ou Sp^-. Les isolats Sp^+ affichaient une efficacité à fixer l'azote qui équivalait à environ 70 % de celle des isolats de type Sp^- (tableau 4).

Cette étude a clairement démontré que les isolats de type Sp^+ et Sp^- sont différents d'après leurs caractéristiques morphologiques, leur taux de croissance et leur efficacité à fixer l'azote. Les différences morphologiques in vitro sont notées ici pour la première fois. Les différences morphologiques in vivo ont déjà été étudiées par Van Dijk (1978), les différences des taux de croissance et des besoins de croissance in vitro ont été observées par Burggraaf et al. (1981), et les différences dans l'efficacité à fixer l'azote ont été étudiées par Hall et al. (1979), ainsi que par Maynard (1981).

Pour ces raisons, nous suggérons que <<le type de sporulation>> soit retenu comme un paramètre valide pour la définition des espèces du genre Frankia. De plus, les termes <<Sp^+>> et <<Sp^->> qui désignent exclusivement les endophytes devraient être remplacés par les expressions <<type P>> et <<type N>> pour désigner respectivement les isolats Frankia de types Sp^+ et Sp^-, tous deux dans leurs conditions endophytiques et de culture pure (in vitro).

5,4 Évaluation des stérilisants

Seul le H_2O_2 à 30 %, le NaClO à 5 % et le brome à 0,1 % peuvent être recommandés pour la stérilisation de surface des graines d'A. crispa. L'éthanol et le OsO_4 n'ont pas donné des pourcentages satisfaisants de stérilisation de surface (plus de 80 %) sans affecter la vitalité des semis. La merthiolate a permis d'obtenir jusqu'à 63 % de semis germés sans croissance bactérienne ou fongique, mais il est décrit comme un agent bactériostatique (Brewer, 1957) et n'agit comme bactéricide qu'après de longues expositions, en-deçà desquelles les semis sont perturbés. L'utilisation du merthiolate (Jobidon et Thibault, 1980) peut s'avérer efficace pour retarder la croissance des contaminants et donner un bon départ aux semis, mais ne peut certainement pas être recommandée lorsqu'il faut des plantes hôtes axéniques pour les études de nodulation sur des <<aides>> (Knowlton et al., 1979).

Le brome a donné des résultats satisfaisants, mais le temps de traitement a été jugé critique et ne doit pas dépasser cinq minutes. Les principaux inconvénients de ce produit et du OsO_4 sont leur volatilité et leur toxicité pour les humains.

Le NaCℓO aurait pu également permettre d'obtenir de forts pourcentages de semis utilisables, mais le temps d'exposition optimal était critique et, également, variable. Cela était dû au mode d'action du NaCℓO qui pénètre les téguments par digestion. De légères différences dans les paramètres expérimentaux, tels que la température, pourraient avoir causé les résultats erratiques obtenus avec NaCℓO. Un temps d'exposition plus long qui celui du traitement au H_2O_2 a été nécessaire pour obtenir un grand nombre de semis axéniques, mais des semis mal formés ont été observés à des fréquences élevées lorsque le traitement durait plus longtemps que 30 minutes.

Ces essais effectués avec tous les stérilisants de surface mentionnés dans la littérature sur les graines d'aulnes sont les premiers essais systématiques à avoir été faits. Il semble que les méthodes décrites ici sont valides et devraient être appliquées lorsque l'on commence à travailler sur une nouvelle espèce.

Le H_2O_2 à 30 % stabilisé avec du Tween 20 comme surfactant et appliqué à la température de la pièce pendant 5 à 30 minutes, tel que recommandé par Neal et al. (1967), s'est révélé le stérilisant de surface le plus fiable pour les graines d'A. crispa. Il permet d'obtenir jusqu'à 90 % de semis utilisables, c'est-à-dire des plants axéniques et normaux. Le peroxyde d'hydrogène est un composé organiquement catabolisable qui ne laisse aucun résidu toxique.

6. CONCLUSIONS

Dans le cadre d'un vaste programme, 250 souches Frankia provenant d'Alnus cripsa, A. rugosa, A. viridis, A. glutinosa, A. serrulata, Myrica gale et Shepherdia canadensis ont été isolées, ce qui représente une large proportion du spectre des variations naturelles observées chez les endophytes Frankia d'A. crispa et A. rugosa. Il faut souligner que même si le traitement au OsO_4 est une méthode d'isolement facile à utiliser, fiable et rapide et qu'il a permis pour la première fois d'isoler in vitro des mutants non sporulants, les techniques et les conditions de croissance utilisées ne sont pas adéquates pour certaines souches Sp^+. Il a été beaucoup plus difficile d'isoler les souches Sp^+ en culture pure dans le cas d'A. rugosa, A. serrulata et A. glutinosa que dans le cas d'A. viridis, A. crispa et M. gale, ce qui suggère une influence de la plante hôte. Cette influence pourrait être attribuable aux composés phénoliques qui semblent se trouver en plus grande quantité dans A. rugosa, A. serrulata et A. glutinosa que dans A. crispa, A. viridis et M. gale. L'intensité du rougissement de la solution de broyage PVPPBS est un indicateur fiable de la concentration du composé phénolique. La plupart des isolats se divisaient en deux groupes d'après leur morphologie: les groupes Sp^+ et Sp^-, qui affichent des différences dans le nombre et la taille des sporanges et la densité des colonies. D'autres n'avaient que des sporanges peu abondants et de petite taille. Aucun n'était pigmenté. Tous les isolats testés se sont révélés infectieux sur une plante hôte compatible.

Les essais biochimiques sont toujours utiles en taxonomie. Dans notre étude, cet essai a été important pour confirmer les supposés indicateurs basés sur la morphologie ou l'infectivité. Il est apparu que l'analyse chromatographique des sucres des hydrolysats de cellules entières des supposés isolats Frankia pouvait soit confirmer ou infirmer l'identification basée sur d'autres critères. La cellule Frankia peut être définie par les huit sucres suivants: rhamnose, xylose, 2-O-méthyl-D-mannose, ribose, mannose, galactose, glucose et inositol. L'un de ces sucres, 2-O-méthyl-D-mannose, peut être défini comme un marqueur de Frankia. Il faut toutefois souligner ici que tous les genres de bactéries n'ont pas été testés et que l'absence de 2-O-méthyl-D-mannose dans la littérature sur la taxonomie n'exclut pas qu'on en parle ailleurs. Par conséquent, l'analyse du spectre des sucres, davantage que la détection de 2-O-méthyl-D-mannose, est un outil utile pour l'identification positive d'un isolat comme appartenant au genre Frankia. Mais l'analyse des sucres ne peut donner d'information telle que des renseignements sur le type de sporulation ou l'origine de la plante hôte, parce que tous les isolats testés présentaient des spectres similaires.

L'évaluation de l'efficacité des souches à fixer l'azote a été faite par la mesure de la biomasse produite par les semis d'A. crispa cultivés en l'absence totale d'azote fixé. La principale source de variation venait du type de sporulation. Les grappes Sp^+ sont apparues comme ayant une efficacité équivalent à environ 70 % de celles des grappes Sp^-. L'origine de la plante hôte ne causait aucune différence significative. Des différences importantes ont parfois été observées entre les isolats d'une même origine, ce qui valide notre procédure qui consistait à isoler jusqu'à 10 isolats de la même origine.

Le type de sporulation influence la morphologie et le taux de croissance *in vitro* de même que l'efficacité à fixer l'azote *in vivo*. Nous proposons par conséquent que le type de sporulation soit utilisé comme une base valide pour la définition des espèces du genre *Frankia*.

Le peroxyde d'hydrogène stabilisé (30 % vol./vol.) est recommandé comme stérilisant fiable pour stériliser la surface des graines d'*Alnus crispa* pour obtenir des semis axéniques.

7. RÉFÉRENCES

Akkermans, A.D.L. 1971. Nitrogen fixation and nodulation of Alnus and Hippophaë under natural conditions. Ph.D. Thesis. Rijks - Universiteit, Leiden, Netherlands.

Akkermans, A.D.L.; Houwers, A. 1979. Symbiotic nitrogen-fixers for use in temperate forestry. Pages 23-27 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Angulo Carmona, A.F. 1974. La formation des nodules fixateurs d'azote chez Alnus glutinosa (L.) Vill. Acta Bot. Neerl. 23: 257-303.

Armson, K.A. 1977. Forest soils: properties and processes. Univ. of Toronto Press, Toronto.

Athalye, M.; Lacey, J.; Goodfellow, M. 1981. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. J. Appl. Bacteriol. 51: 289-297.

Baker, D.; Lechevalier, M.P.; Dillon, J.T. 1981a. Strain analysis of actinorhizal microsymbionts (genus: Frankia). Page 479 in Gibson, A.M.; Newton, W.E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Austral. Acad. Sci., Canberra.

Baker, D.; Kidd, G.H.; Torrey, J.G. 1979a. Separation of actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspensions by Sephadex fractionation. Bot. Gaz. 140: S49-S51.

Baker, D.; Kidd, G.H.; Torrey, J.G. 1979b. Isolation by sucrose density fractionation and cultivation in vitro of actinomycetes from nitrogen fixing root nodules. Nature 281: 76-79.

Baker, D.; Newcomb, W.; Torrey, J.G. 1980. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, Frankia sp. Eul1 (Actinomycetales). Can. J. Microbiol. 26: 1072-1089.

Baker D.; Pengelly, W.L.; Torrey, J.G. 1981b. Immunochemical analysis of relationships among isolated Frankia (Actinomycetales). Int. J. System. Bacteriol 31: 148-151.

Baker, D.; Torrey, J.G. 1979. The isolation and cultivation of actinomycetous root nodule endophytes. Pages 38-56 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Baker, D.; Torrey, J.G. 1980. Characterization of an effective actinorhizal microsymbiont, Frankia sp. Avcl1 (Actinomycetales). Can. J. Microbiol. 26: 971-977.

Becking, J.H.; Deboer, W.E.; Houwink, A.L. 1964. Electron microscopy of the endophyte of Alnus glutinosa. Antonie Leuwenhoek J. Microbiol. Serol. 30: 343-376.

Benecke, V. 1970. Nitrogen fixation by Alnus viridis (Chaix) DC. Plant and Soil 33: 30-48.

Benson, D.R.; Eveleigh, D.E. 1979. Ultrastructure of the nitrogen-fixing symbiont of Myrica pensylvanica L. (Bayberry) root nodules. Bot. Gaz. 140S: S15-S21.

Benson, D.R.; Arp, D.J.; Burris, R.H. 1979. Cell-free nitrogenase and hydrogenase from actinorhizal root nodules. Science 205: 688-689.

Bergersen, F.J. 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. Pages 65-110 in Bergerson, F.J. ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley and Sons, Chichester, Eng.

Berry, A.; Torrey, J.G. 1979. Isolation and characterization in vivo and in vitro of an actinomycetous endophyte from Alnus rubra Bong. Pages 69-83 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Beuter, J. 1979. Forest fertilization and the economics of perpetual motion machines. Pages 4-13 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Blom, J.; Roelofsen, W.; Akkermans, A.D.L. 1980. Growth of Frankia Avcl1 on media containing Tween 80 as C-source. FEMS Microbiol. Letters 9: 131-135.

Blom, J. 1981. Utilization of fatty acids and NH^+ by Frankia Avcl1. FEMS Microbiol. Letters 10: 143-145.

Bond, G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L. with special reference to its pH relation and ecological significance. Ann. Bot. N.S. 15: 447-459.

Bowes, B.; Callaham, D.; Torrey, J.G. 1977. Time-lapse photographic observations of morphogenesis in root nodules of Comptonia peregrina (Myricaceae). Am. J. Bot. 64: 516-525.

Brewer, J.H. 1957. Mercurials, inorganic and organic in antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization. Reddish, G.H. ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pa.

Brock, T.D. 1974. Biology of micro-organisms, 2nd ed. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.

Burggraaf, A.J.P.; Quispel, A.; Tak, T.; Valstar, J. 1981. Methods of isolation and cultivation of Frankia species from actinorhizes. Plant and Soil 61: 157-168.

Callaham, D.; Del Tredici, P.; Torrey, J.G. 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in Comptonia. Science 199: 899-902.

Campbell, R. 1977. Microbial ecology. John Wiley and Sons, NY.

Carpenter, P.L.; Hensley, D.L. 1979. Utilizing nitrogen fixing woody plant species for distressed soils and the effect of lime on survival. Bot. Gaz. 140S: S76-S81.

Coles, J.O.; Parks, C.P. 1946. Semi-micro Kjeldahl procedure for control laboratories. Anal. Chem. 18: 61.

Crocker, R.L.; Major, J. 1955. Soil development in relation to vegetation and surface age at Glacier Bay, Alaska. J. Ecol. 43: 427-448.

Dalton, D.A.; Zobel, D.B. 1977. Ecological aspects of nitrogen-fixtion by Purshia tridentata. Plant and Soil 48: 57-80.

Daly, G.T. 1966. Nitrogen fixation by nodulated Alnus rugosa. Can. J. Bot. 44: 1607-1621.

Dawson, J.O.; Gordon, J.C. 1979. Nitrogen fixation in relation to photosynthesis in Alnus glutinosa. Bot. Gaz. 140S: S70-S75.

Dawson, J.O.; Sun, S.H. 1981. The effect of Frankia isolates from Comptonia peregrina and Alnus crispa on the growth of Alnus glutinosa, A. cordata and A. incana clones. Can. J. Forest Res. 11: 758-762.

Dommergues, Y. 1966. La fixation symbiotique de l'azote chez les Casuarina. Ann. Inst. Pasteur III: 247-258.

Fessenden, R.J.; Knowles, R.; Brouzes, R. 1973. Acetylene-ethylene assay studies on excised root nodules of Myrica asplenifolia L. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 37: 893-897.

Fortin, J.A.; Lavellee, R.; Piche, Y. 1979. Forest utilization for energy and the role of nitrogen fixation. A literature review. ENFOR Project #P-9, Environment Canada.

Furlow, J.J. 1979. The systematics of the American species of Alnus (Betulaceae). Part I and II. Rhodora 81: 1-21, 151-248.

Gardner, I.C.; McNally, S.F.; Scott, A. 1979. Electron histochemical localization of the adenyl cyclase activity in the root nodules of Alnus glutinosa. Plant Sci. Lett. 16: 387-395.

Gatner, E.M.S.; Gardner, I.C. 1979. Observations on the fine structure of the root nodule endophyte of Hippophaë rhamnoides L. Arch. f. Microbiol. 70: 183-186.

Gauthier, D.; Diem, H.G.; Dommergues, Y. 1981. In vitro nitrogen fixation by two actinomycetes strains isolated form Casuarina nodules. Appl. Env. Microbiol. 41: 306-308.

Gel'tser, F.Y. 1965. The significance of symbiotrophic micro-organisms (endophytes) for the productivity of plants. Pages 291-295 in Macura, J.; Vancura, V. eds. Plant microbes relationships. Publ. House of the Czechoslovak Acad. of Sci., Prague.

Hall, R.B.; McNabb, H.S.; Maynard, C.A.; Green, T.L. 1979. Toward development of optimal Alnus glutinosa symbioses. Bot. Gaz. 140S: S120-S126.

Heisey, R.M.; Delwiche, C.C.; Virginia, R.A.; Wrona, A.F.; Bryan, B.A. 1980. A new nitrogen-fixing non-legume: Chamaebatia foliolosa (Rosaceae). Am. J. Bot. 67: 429-431.

Hoeppel, R.E.; Wollum, A.G. II. 1971. Histological studies of actomycorrhizae and root nodules form Cercocarpus montanus and Cercocarpus paucidentatus. Can. J. Bot. 49: 1315-1318.

Hunt, G.A.; Trappe, J.M. 1981. Mycorrhizal implications of revegetation following the eruption of Mount St. Helens. Page 44 in Fortin, J.A.; Furlan, V. eds. Fifth N. Am. Conference on Mycorrhizae. Univ. Laval, Québec, P.Q.

Jobidon, R.; Thibault, J.R. 1980. Optimal surface sterilization of Alnus crispa seeds using merthiolate. Forest Sci. 26: 483-484.

Käppel, M.; Wartenberg, M. 1985. Der Formenwechsel des Actinomyces alni Peklo in den Wurzeln von Alnus glutinosa Gaertn. Arch. f. Mikrobiol. 30: 46-63.

Kersters, K. 1970. The application of simplified enzymatic methods in bacterial taxonomy. Pages 299-304 in Pranser, H. ed. The Actinomycetales. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, DDR.

Knights, B.A.; Morton, P.; Wheeler, C.T. 1981. Sterols of roots and nitrogen-fixing root nodules of some non-leguminous species. Phytochem. 20: 2039-2041.

Knowlton, S.; Berry, A.; Torrey, J.G. 1979. The role of rhizosphere microorganisms in nodule formation in Alnus rubra Bong. Page 479 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Koch, B.; Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol. 41: 1748-1750.

Lalonde, M. 1977. Infection process of the Alnus root nodule symbiosis. Pages 569-599 in Newton, W. et al. eds. Recent developments in nitrogen fixation. Acad. Press, London.

Lalonde, M. 1979a. A simple and rapid method for the isolation, cultivation in vitro and characterization of Frankia strains from Alnus root nodules. Page 480 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Lalonde, M. 1979b. Techniques and observations of the nitrogen-fixing Alnus root nodule symbiosis. Pages 421-434 in Subba Rao, N.S. ed. Recent advances in biological nitrogen fixation. Oxford and IBM Publ., New Delhi.

Lalonde, M. 1979c. Immunological and ultrastructural demonstration of nodulation of the European Alnus glutinosa (L.) Gaertn. host plant by an actinomycetal isolate from the North American Comptonia peregrina (L.) Coult. root nodule. Bot. Gaz. 140: S35-S43.

Lalonde, M.; Calvert, H.E. 1979. Production of Frankia hyphae and spores as an infective inoculant for Alnus species. Pages 95-110 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Lalonde, M.; Calvert, H.E.; Pine, S. 1981. Isolation and use of Frankia strains in actinorhizae formation. Pages 296-299 in Gibson, A.H.; Newton, W.E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Austral. Acad. Sci. Canberra.

Lalonde, M.; Fortin, J.A. 1972. Formation de nodules racinaires axéniques chez Alnus crispa var. mollis. Can. J. Bot. 50: 2597-2600.

Lalonde, M.; Fortin, J.A. 1973. Microscopie photonique des nodules racinaires axéniques d'Alnus crispa var. mollis. Can. J. Microbiol. 19: 1115-1118.

Lalonde, M.; Knowles, R. 1975a. Ultrastructure, composition and biogenesis of the encapsulation material surrounding the endophyte in Alnus crispa var. mollis root nodules. Can. J. Bot. 53: 1951-1971.

Lalonde, M.; Knowles, R. 1975b. Ultrastructural of the Alnus crispa var. mollis Fern. root nodule endophyte. Can. J. Microbiol. 21: 1058-1080.

Lalonde, M.; Knowles, R.; Fortin, J.A. 1975. Demonstration of the isolation of non-infective Alnus crispa var. mollis Fern. root nodule endophyte by morphological immuno-labelling and whole cell composition studies. Can. J. Microbiol. 21: 1901-1920.

Lalonde, M.; Quispel, A. 1977. Ultra-structural and immunological demonstration of the nodulation of the European Alnus glutinosa (L.) Gaertn. host plant by the North American Alnus crispa var. mollis Fern. root nodule endophyte. Can. J. Microbiol. 23: 1529-1547.

Lechevalier, M.P.; Gerber, N.N. 1970. The identity of madurose with 3-O-methyl-D-galactose. Carbohyd. Res. 13: 451-454.

Lechevalier, M.P.; Lechevalier, H.A. 1970. Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Pages 311-316 in Pranser, H. ed. The Actinomycetales. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, DDR.

Lechevalier, M.P.; Lechevalier, M.A. 1979. The taxonomic position of the actinomycetic endophytes. Pages 111-123 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Loomis, W.D.; Battaille, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem. 5: 423-438.

Marie-Victorin, Fr. 1964. La flore laurentienne, 2ième éd. Presses de l'Université de Montréal.

Maynard, C.A. 1980. Host-symbiont interaction among Frankia strains and Alnus open-pollinated families. Ph.D. Thesis. Iowa State Univ. Ames, Iowa.

McLean, J.E. 1981. Nitrogen fixation in Shepherdia canadensis (L.) Nutt. M.Sc. Thesis, Univ. of Alberta, Edmonton, Alta.

Moiroud, A.; Capellano, A. 1979. Étude de la dynamique de l'azote à haute altitude. I. Fixation d'azote (réduction de l'acetylène) par Alnus viridis. Can. J. Bot. 57: 1979-1985.

Morris, M.; Eveleigh, D.E.; Riggs, S.C.; Tiffney, A.N. 1974. Nitrogen- fixation in the bayberry (Myrica pensylvanica) and its role in coastal succession. Am. J. Bot. 61: 867-870.

Morrison, R.T.; Boyd, R.N. 1973. Organic chemistry, 3rd ed. Allyn and Bacon Inc., Boston, Mass.

Mort, A.; Lalonde, M. 1981. 2-O-methyl-D-mannose, a key sugar in the taxonomy of Frankia. Plant Physiol. 67: 134.

Neal, J.L., Jr.; Trappe, J.M.; Lu, K.C.; Bollen, W.B. 1967. Sterilization of red alder seedcoats with hydrogen peroxide. Forest Sci. 13: 104-105.

Okanishi, M.; Okami, Y. 1976. An aspect of phylogenetic relationships among Streptomycetes with special reference to DNA homology and electrophoretic patterns of C-type cytochrome. Pages 87-96 in Arai, T. ed. Actinomycetes, the boundary microorganisms. Toppan Co. Ltd., Tokyo.

Perrot-Rechenmann, C.; Vidal, J.; Madinas, B.; Gadal, P. 1981. Immunocytochemical study of phosphoenol pyruvate carboxylase in nodulated Alnus glutinosa. Planta 151: 1-4.

Petrides, G.A. 1958. A field guide to trees and shrubs, 2nd ed. Houghton Mifflin Co., Boston, Mass.

Pizelle, G.; Thiery, G.A. 1977. Variations saisonnières des activités nitrogenase et nitrate reductase chez l'aulne glutineux (Alnus glutinosa L. Gaertn.) Physiol. Veg. 15: 333-342.

Pollack, J.B. 1981. Atmospheres of the terrestrial planets. In Beatty, J.K. et al. eds. the new solar system. Sky Publ. Corp. and Cambridge University Press, Cambridge, Mass.

Postgate, J. 1978. Nitrogen fixation. Edward Arnold Publ. Ltd., London, England.

Postgate, J. 1979. Foreword. Page vxiv in Subba Rao, N.S. ed. Recent advances in biological nitrogen fixation. Oxford and IBM Publishing Co., New Delhi, India.

Quispel, A. 1954. Symbiotic nitrogen fixation non leguminous plants. Acta Bot. Neerl. 3: 495.

Quispel, A. 1955. Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants III. Experiments on the growth in vitro of the endophyte of Alnus glutinosa. Acta Bot. Neerl. 4: 671-689.

Quispel, A. 1979. Growth and infectivity of the endophyte of Alnus glutinosa. Pages 57-68 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Quispel, A.; Burggraaf, A.J.P. 1981. Frankia, the diazotrophic endophyte from actinorhizas. Pages 229-236 in Gibson, A.H.; Newton, W.E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Austral. Acad. Sci., Canberra.

Resch, H. 1980. Utilization of red alder in the Pacific Northwest. Forest Prod. J. 30: 21-26.

Richard, P. 1977. Histoire Post-Wisconsinienne de la végétation du Québec méridional par l'analyse pollinique. Service de la recherche, Direction générale des forêts, Ministère des Terres et forêts. 2 tomes.

Righetti, T.L.; Munns, D.N. 1980. Nodulation and nitrogen fixation in cliffrose (Cowania mexicana var. stansburiana (Torr.) esp.) Plant Physiol. 65: 411-412.

Rodriguez-Barrueco, C. 1968. The occurrence of the root-nodule endophytes of Alnus glutinosa and Myrica gale in soils. J. Gen. Microbiol. 52: 189-194.

Rottink, B.A.; Strand, R.F.; Bentley, W.R. 1979. Industrial forestry requirements for alternative nitrogen sources. Pages 14-22 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Rottink, B.A. 1980. International directory of researchers in biological nitrogen fixation relevant to wildland and forest management. Crown Zellerbach special publication no. 1.

Russell, E.J. 1973. Soil conditions and plant growth, 10th ed. Longman, London, England.

Ruvkun, G.B.; Ausubel, F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:P 191-195.

Silvester, W.B.; Carter, D.A.; Sprent, J.I. 1979. Nitrogen input by Lupinus and Coriaria in Pinus radiata forest in New Zealand. Pages 253-265 in Gordon, J.C. et al. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State Univ., Corvallis.

Skeffington, R.A.; Stewart, W.D.P. 1976. Evidence from inhibitor studies that the endophyte synthesizes nitrogenase in the root nodules of Alnus glutinosa L. Gaertn. Planta 129: 1-6.

Sloger, C. 1968. Nitrogen fixation by tissues of leguminous and non-leguminous plants. Ph.D. Thesis, University of Florida, Gainesville.

Smathers, G.A.; Gardner, D.E. 1979. Stand analysis of an invading Firetree (Myrica faya Aiton) population, Hawaii. Pacific Sci. 33: 239-255.

Tarrant, R.F.; Trappe, J.M. 1971. The role of Alnus in improving the forest environment. Plant and Soil, Special Volume 335-348.

Tjepkema, J.D. 1979. Oxygen relation sin leguminous and actinorhizal nodules. Pages 175-186 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen-fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Tjepkema, J.D.; Oremerod, W.; Torrey, J.G. 1980. Vesicle formation and acetylene reduction activity in Frankia sp. Cpl1 cultured in defined nutrient media. Nature 287: 522-635.

Tran Van Nao. 1974. Fertilizers in forest management. Span 17: 68-72.

Turner, W.B. 1973. Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. Pages 209-218 in Sykes, G.; Skinner, F.A. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Academic Press. London, England.

Ugolini, F.C. 1968. Soil development and alder invasion in a recently deglaciated area of Glacier Bay, Alaska. Pages 115-140 in Trappe, J.M. et al. eds. Biology of Alder. USDA Forest Serv., Pacific Northwest For. and Range Exp. Sta. Portland, Ore.

Van Dijk, C. 1978. Spore formation and endophyte diversity in root nodules of Alnus glutinosa (L.) Vill. New Phytol. 81: 601-615.

Van Dijk, C.; Merkus, E. 1976. A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of Alnus glutinosa (L.) Gaertn. New Phytol. 77: 73-91.

Van Hove, C. 1976. Bacterial-leaf symbioses and nitrogen fixation. Pages 551-560 in Nutman, P.S. ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. IBP #7. Cambridge Univ. Press.

Vincent, J.M. 1977. Rhizobium: General microbiology. Pages 277-472 in Hardy, R.W.F.; Silver, W.S. eds. A Treatise on dinitrogen fixation. Section III: Biology. John Wiley & Sons, NY.

Waksman, S.A. 1959. The Actinomycetes Vol. 2: Classification, identification, and description of genera and species. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.

Waughman, G.J. 1972. The effect of varying oxygen tension, temperature and sample size on acetylene reduction by nodules of Alnus and Hippophaë. Plant and Soil 37: 521-528.

Wheeler, C.T. 1969. The diurnal fluctuation in nitrogen-fixation in the nodules of Alnus glutinosa and Myrica gale. New Phytol. 68: 675-682.

Winship, L.S.; Chaudhary, A.H. 1979. Nitrogen-fixation by Datisca glomerata: a new addition to the list of actinorhizal diazotrophic plants. Page 485 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

Wollum, A.G., II; Youngberg, C.T.; Chichester, F.W. 1968. Relation to previous timber stand age to nodulation of Ceanothus velutinus. Forest Sci. 14: 114-118.

Wollum, A.G., II; Davey, C.B. 1975. Nitrogen accumulation, transformation and transport in forest soils. Pages 67-106 in Bernier, B.; Winget, C.H. eds. Forest soils and forest management. Les Presses de l'Université Laval, Québec.

Youngberg, C.T.; Wollum, A.G., II. 1976. Nitrogen accretion in developing Ceanothus velutinus stands. Soil Sci. Soc. of Am. J. 40: 109-112.

Zavitkovski, J.; Hansen, E.A.; McNeel, H.A. 1979. Nitrogen fixing species in short rotation systems for fiber and energy production. Pages 388-402 in Gordon, J.C. et al. eds. Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Oregon State University, Corvallis.

ANNEXE A

On trouvera ici une description des acronymes utilisés dans ce rapport ainsi qu'une liste des espèces actinorhizes connues jusqu'à présent (d'après Akkermans et Houwers, 1979).

Signification des acronymes

Nous avons donné un acronyme aux isolats Frankia selon le système établi par Lalonde et al. (1981). D'abord, une lettre ou un groupe de lettres sert à décrire l'espèce hôte (p. ex. AC pour A. crispa, ARg pour A. rugosa, T pour les isolats obtenus sur des semis poussés dans des sacs de culture inoculés avec des sols contenant Frankia), puis une lettre désigne si des sporanges ont été observées ou non dans les nodosités à partir desquelles la souche a été isolée (p. ex. ACN7a est un isolat obtenu d'un endophyte non sporulant et ArgN/P18 désigne un isolat provenant d'un endroit où les deux types ont été obtenus). Vient ensuite un nombre arbitraire donné à chaque lieu d'origine et une lettre pour identifier les différents isolats de la même origine (ACN14a, ACN14b, ..., ACN14j). Quelquefois, placées en exposant, des lettres servent à indiquer le fait que la souche a été isolée de nouveau d'une espèce hôte différente ($ACN8a^{AG}$ est un isolat ACN8a obtenu à l'origine d'A. crispa puis isolé de nouveau à partir d'A. glutinosa). Lorsque ces lettres sont soulignées, cela veut dire que la plante hôte a été inoculée avec un inoculum de nodosités broyées (Lalonde, 1979a) et que l'isolement a ensuite été fait sans un isolement direct antérieur ($ARgP5^{\underline{AG}}$).

$Tn15a^{\underline{AC}}$ par exemple est l'isolat <<a>> provenant du lieu d'origine <<15>>, dont un échantillon de sol séché (<<T>>) a été inoculé dans A. crispa (AC) et qui a produit des nodules Sp^- (N).

Tableau 10. Liste des genres et des espèces de plantes actinorhizes et acronymes proposés

ALNUS spp.			
accuminata	AA	nepalensis	AN
cordata	ACo	nitida	ANi
cremastogyne	ACr	oblongifolia	AO
crispa	AC	orientalis	AOr
fauriei	AFa	pendula	AP
firma	AF	rhombifolia	AR
fermosana	AFo	rubra	ARb
fructicosa	AFu	rugosa	ARg
glutinosa	AG	serrulata	AS
hirsuta	AH	serrulatoides	ASe
incana	AI	siberica	ASb
inokumai	Aln	sieboldiana	ASo
japonica	AJ	sinuata	ASi
jorullensis	AJo	subcordata	ASu
lanata	AL	tenuifolia	AT
maritima	AM	tinctoria	ATi
matsumurae	AMa	trabeculosa	ATr
maximowiczii	AMi	undulata	AU
mayrii	AMy	viridis	AV
multinervis	AMu		

CASUARINA spp.			
cunninghamiana	CaC	muricata	CaMu
decussata	CaD	nana	CaN
deplancheii	CaDe	nodiflora	CaNo
distyla	CaDi	papuana	CaP
equisetifolia	CaE	pusilla	CaPu
fraseriana	CaF	quadrivalvis	CaQ
glauca	CaG	rigida	CaR
huegeliana	CaH	rumphiana	CaRu
lepidophloia	CaL	stricta	CaS
littoralis	CaLi	sumatrana	CaSu
montana	CaM	tenuissima	CaT
muellerana	CaMe	torulosa	CaTo

CEANOTHUS spp.			
americanus	CeA	diversifolius	CeDf
azureus	CeAz	fendleri	CeF
cordulatus	CeC	foliosus	CeFo
crassifolius	CeCr	fresnensis	CeFr
cuneatus	CeCu	glabra	CeG
delilianus	CeD	gloriosus	CeGo
divaricatus	CeDa	greggii	CeGe
grieus	CeGi	oliganthus	CeO
impressus	CeIm	ovatus	CeOv
incana	CeIn	parvifolius	CeP

Tableau 10 (suite)

	intergerrimus	CeI	prostratus	CePr
	intermedius	CeId	rigidus	CeR
	jepsonii	CeJ	sanguineus	CeS
	leucodermis	CeL	sorediatus	CeSo
	microphyllus	CeM	thyrsiflorus	CeT
			velutinus	CeV
CERCOCARPUS spp.				
	betuloides	CrB		
	ledifolius	CrL		
	montanus	CrM		
	paucidentatus	CrP		
CHAMAEBATIA spp.				
	foliolosa	ChF		
COLLETIA				
	cruciata	CiC		
	paradoxa	CiP		
COMPTONIA spp.				
	peregrina	Cp		
CORIARIA spp.				
	angustissima	CoA	nepalensis	CoN
	arborea	CoAr	plumosa	CoP
	intermedia	CoI	pottsiana	CoPo
	japonica	CoJ	pteridoides	CoPt
	kingiana	CoK	sarmentosa	CoS
	lurida	CoL	thymifolia	CoT
	myrtifolia	CoM		
COWANIA spp.				
	mexicana var. stansburiana			CwM
DATISCA spp.				
	canabina	DaC		
	glomerata	DaG		
DISCARIA spp.				
	toumatou	DiT		

Tableau 10 (suite)

DRYAS spp.				
Dryas	drummondii	DyD		
	integrifolia	DyI		
ELAEAGNUS spp.				
	angustifolia	EA	macrophylla	Em
	argentea	EAr	matsunoana	EMa
	commutata	EC	montana	EMo
	conferta	ECo	multiflora	EMu
	edulis	EE	murakamiana	EMk
	formosana	EF	numajriensis	EN
	glabra	EG	pungens	EP
	latifolia	EL	rhamnoides	ER
	longipines	ELo	umbellata	EU
	longipes	ELo	yoshinoi	EY
HIPPOPHAË spp.				
	rhamnoides	HR		
MYRICA spp.				
	adenophora	MA	javanica	MJ
	brevifolia	MB	kandtiana	MK
	californica	MCa	kraussiana	MKr
	cerifera	MC	microbractea	MM
	conifera	MCo	pensylvanica	MP
	cordifolia	MCd	pilulifera	MPi
	diversifolia	MD	pubescens	MPu
	esculenta	ME	querciflora	MQ
	faya	MF	rubra	MR
	gale	MG	salicifolia	MS
	humidis	MH	sapida	MSa
	integra	MI	serrata	MSe
PURSHIA spp.				
	glandulosa	PG		
	tridentata	PT		
RUBUS spp.				
	ellipticus	RE		
SHEPHERDIA spp.				
	argentea	SA		
	canadensis	SC		

ANNEXE B

Figures

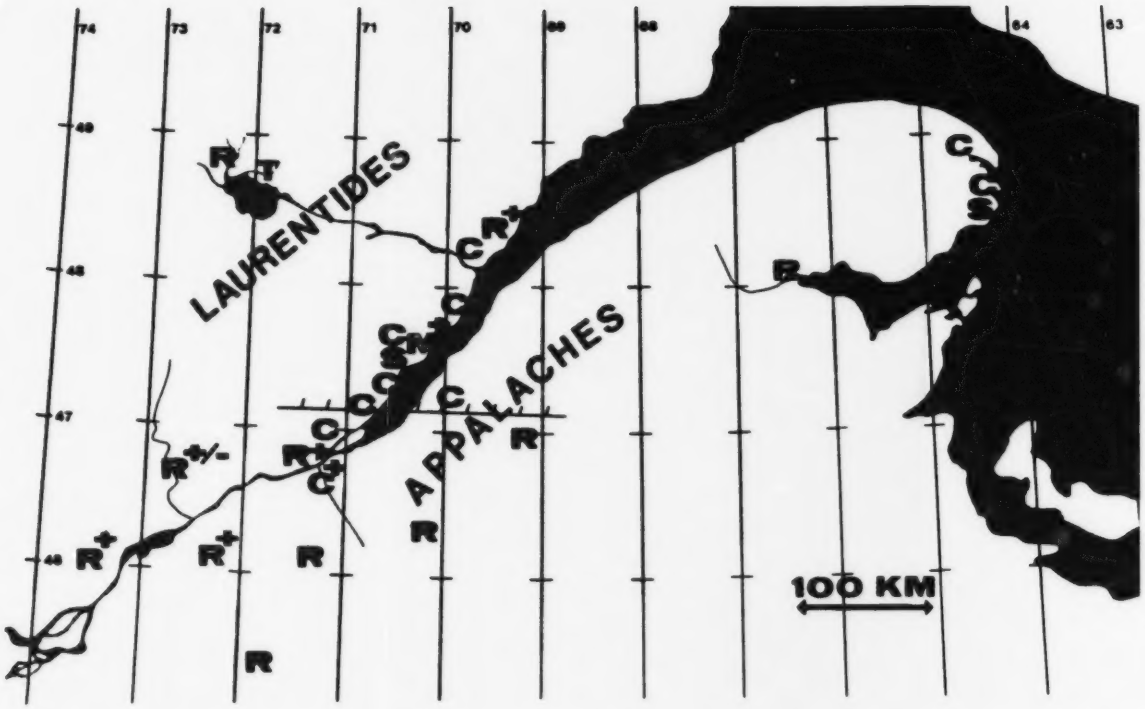
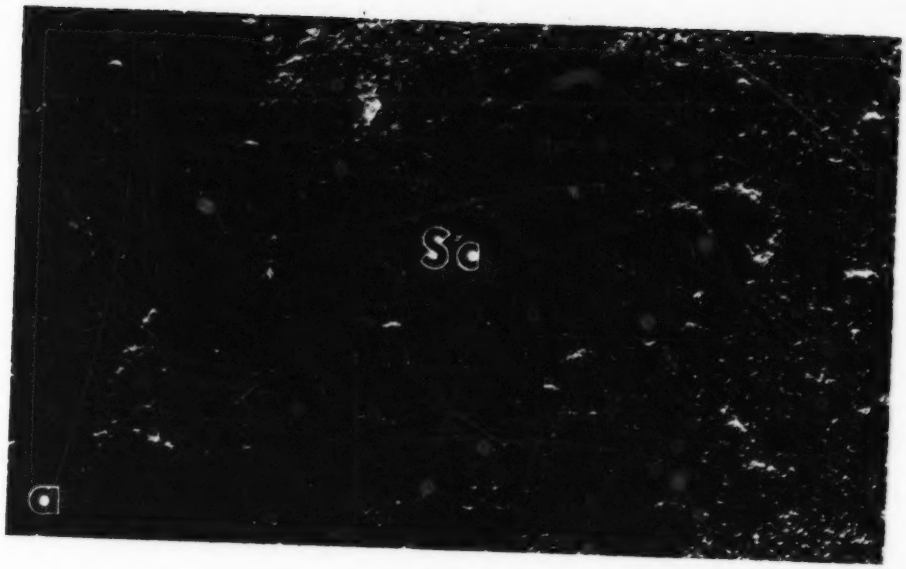


FIGURE 1. Carte du sud du Québec. Les principaux cours d'eau apparaissent en foncé, les plaines inondables du St-Laurent et du Saguenay en blanc et les terres d'une altitude supérieure à 500 pieds en gris pâle. <<R>> désigne les lieux d'origine d'Alnus rugosa, <<C>> d'A. crispa, <<M>> de Myrica gale, <<S>> de Shepherdia canadensis, et <<+>> les isolants obtenus de sols inoculés aux semis d'A. crispa. Un <<+>> placé après la lettre signifie que les isolats étaient du type Sp^+, <<+/->> que les deux types d'isolats se trouvaient dans cet endroit et l'absence de tout signe signifie que les isolats étaient du type Sp^-. La ligne hachurée représente la limite méridionale approximative de l'occurrence d'A. crispa des deux côtés du fleuve sur le 47° parallèle.



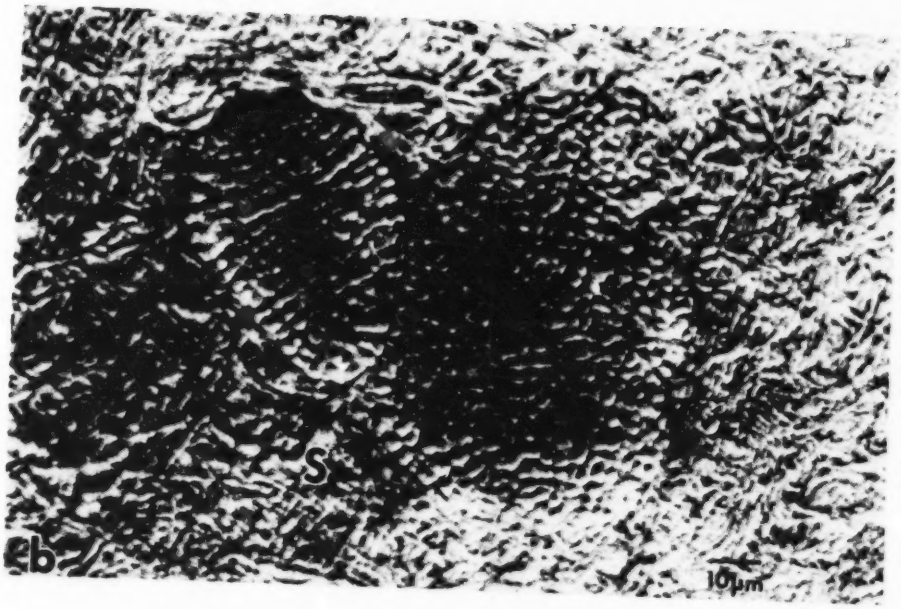


FIGURE 2. Photographie de l'isolat ACN14a, typique de la majorité des isolats Sp^-, cultivé dans un milieu Qmod B pendant quatre semaines. Optiques par contraste d'interférence (barre=50 µm). Les agrégats sphériques sont des grappes de sporanges (Sc) sur un fond d'hyphes. FIGURE 2b. Les sporanges (S) contenant des spores et des hyphes sphériques non mobiles de l'isolat ACN14a (barre=10 µm).

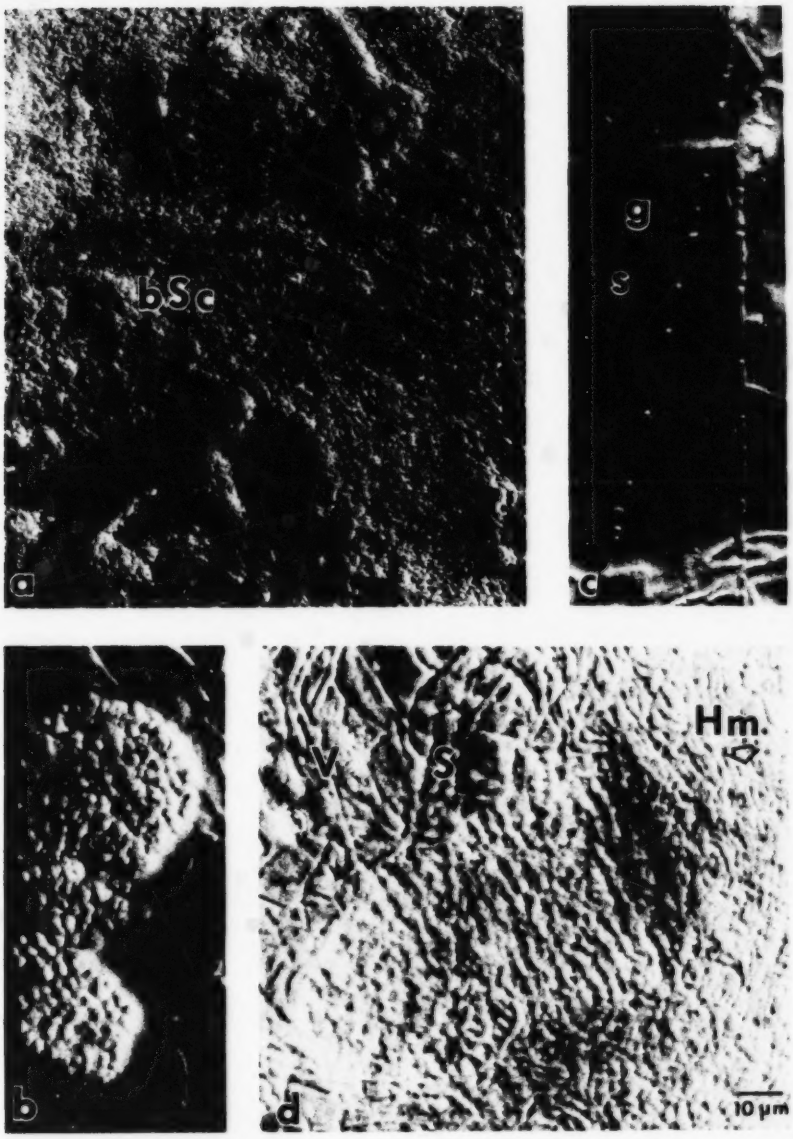


FIGURE 3a. Photographie d'une colonie de l'isolat MGP 10i, typique des isolats Sp^+, cultivé dans un milieu Qmod B-FBS pendant trois semaines (barre=50 µm). Les formes plus foncées sont des grappes de sporanges (bSc) incrustées dans une épaisse matrice fongique. FIGURE 3b. Sporanges poussant à l'extérieur de la matrice fongique et présentant un développement différent de spores de bas en haut (barre=10 µm). FIGURE 3c. Hyphes dont on voit le cloisonnement (s) après traitement à l'acide acétique (30 %) pour dissoudre les cristaux de $CaCO_3$ Qmod B. Les grumaux que l'on observe dans le cytoplasme fongique rabougri sont probablement des granules lipides (g) (barre=10 µm). FIGURE 3d. Sporanges (s) incrustés dans la dense matrice fongique (µm); une vésicule rare (v) peut être observée (barre=10 µm).

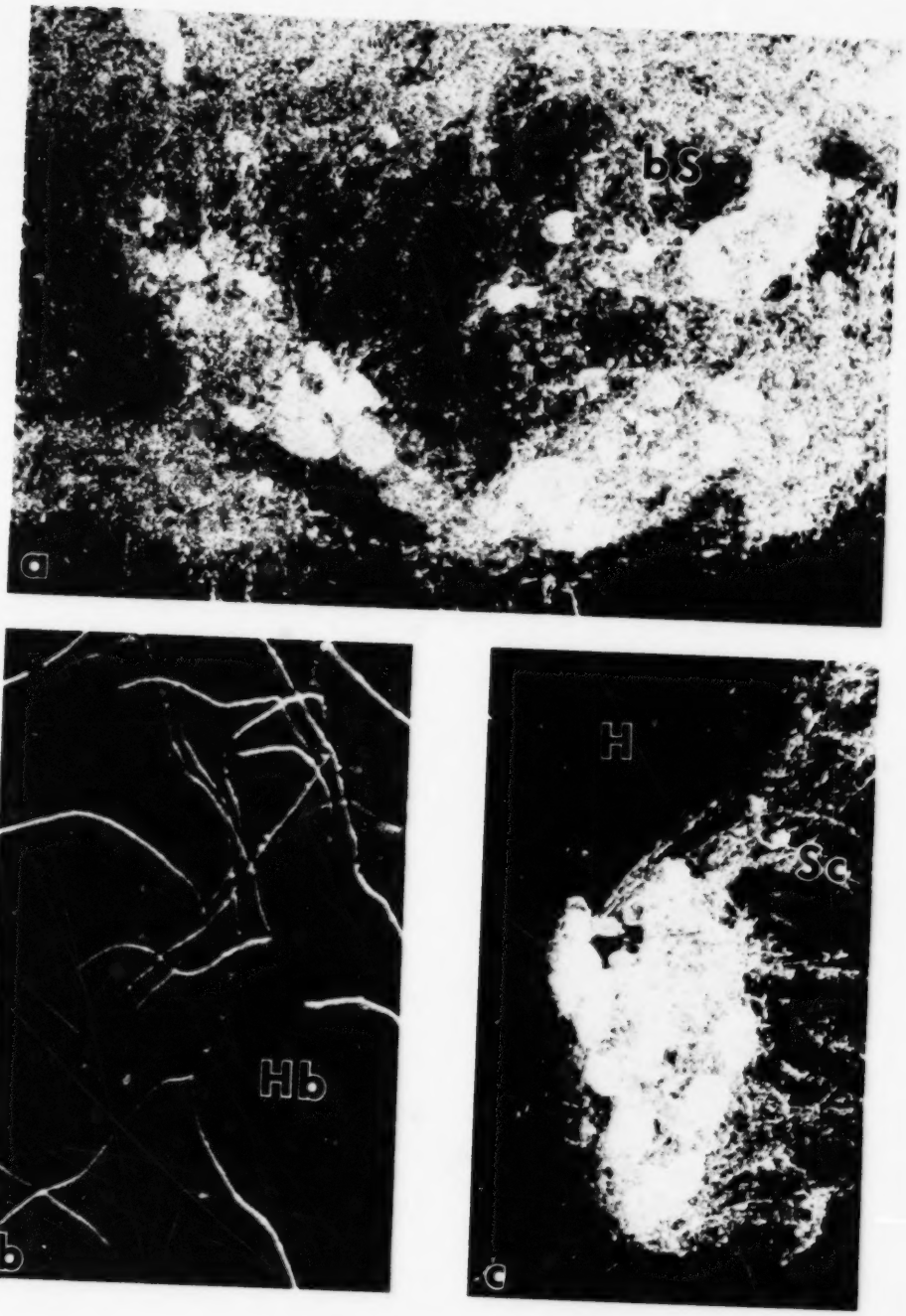


FIGURE 4a. Sporanges gros et nombreux (bS) de l'isolat Frankia ARgP5^{AG} cultivé dans un milieu Qmod B pendant trois semaines (barre=50 µm).
FIGURE 4b. Ramification (Hb) et granules lipides des hyphes (barre=10 µm).
FIGURE 4c. Grappes d'hyphes (H) et de sporanges (Sc) d'une colonie de ARgP5^{AG}. Remarquer la taille et la densité des sporanges (barre=50 µm).

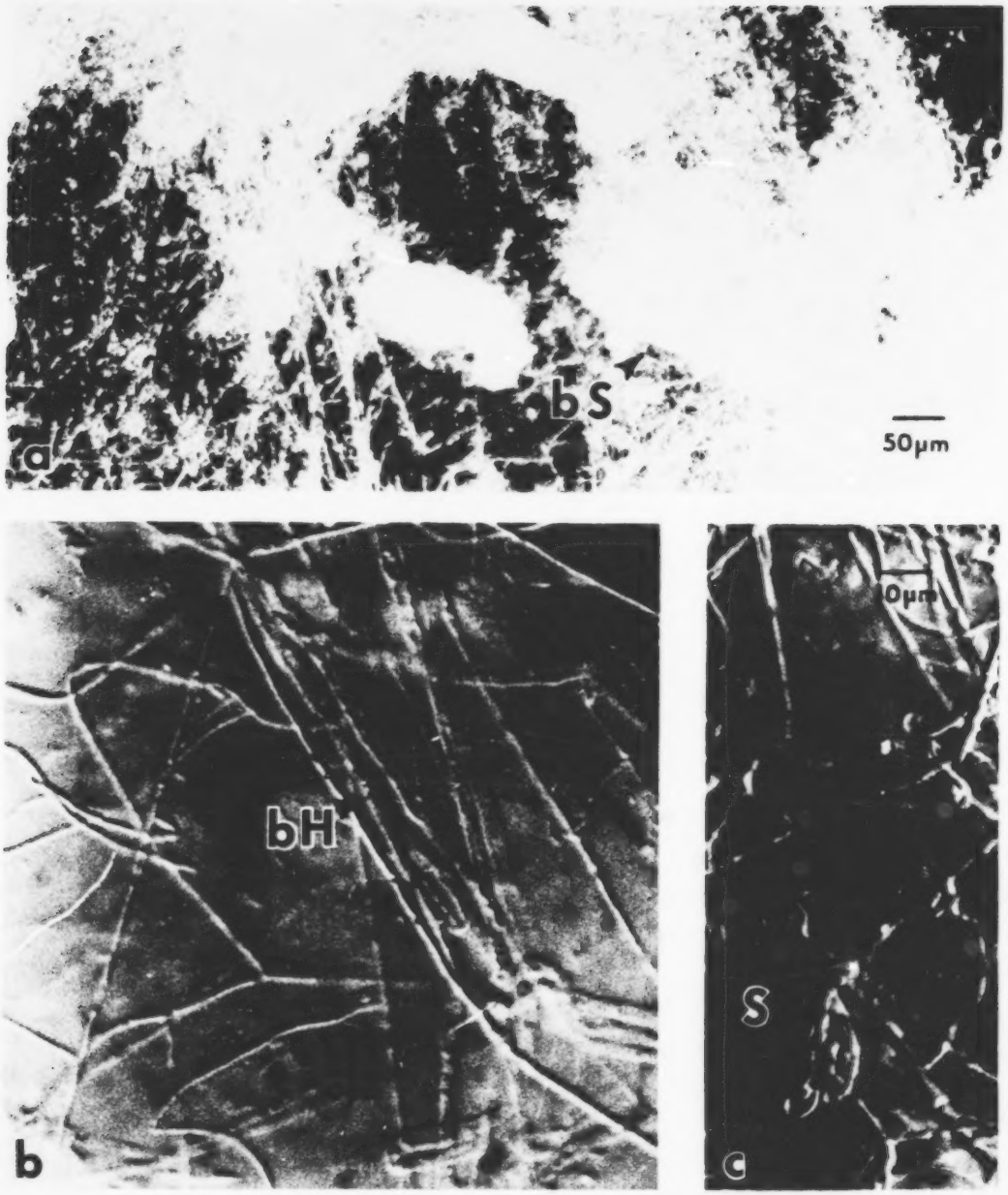
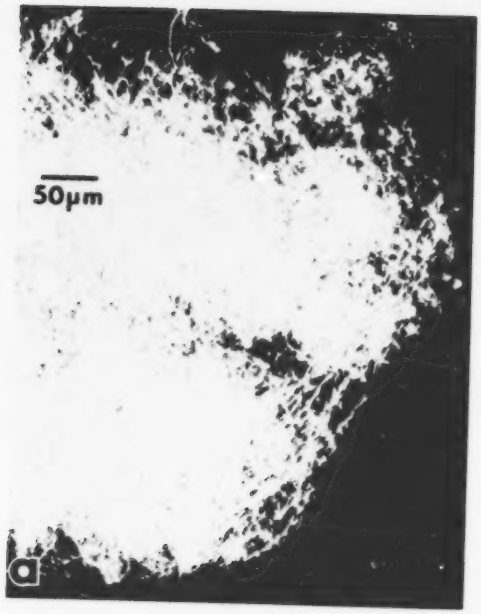
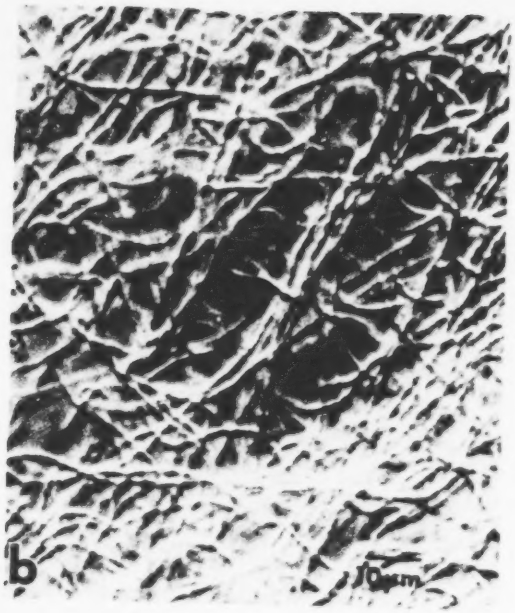


FIGURE 5a. Gros sporanges de l'isolat Frankia ARgP5$\frac{AGAC}{}$, qui a été isolé de nouveau à partir d'A. crispa inoculé avec ARgP5$\frac{AG}{}$, cultivé dans un milieu Qmod B pendant trois semaines. Noter la similarité entre cette figure et la figure 4a (barre=50 µm). FIGURE 5b. Gros hyphes (bH) qui sont de jeunes sporanges intercalaires en développement (barre=10 µm). FIGURE 5c. Sporanges intercalaires (S) en début de maturation (barre=10 µm).





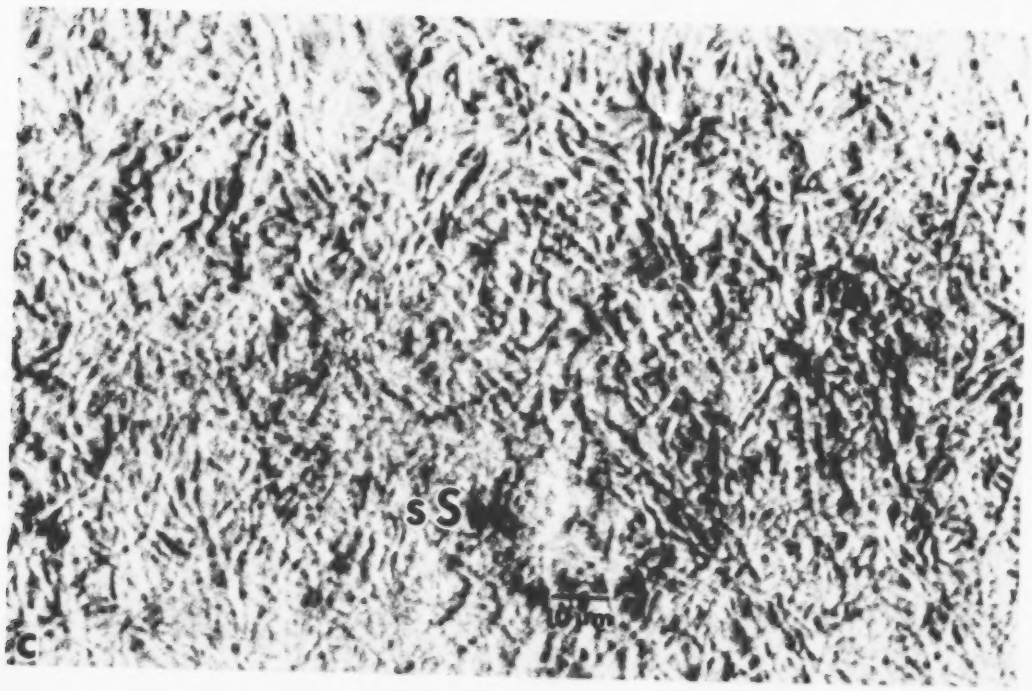
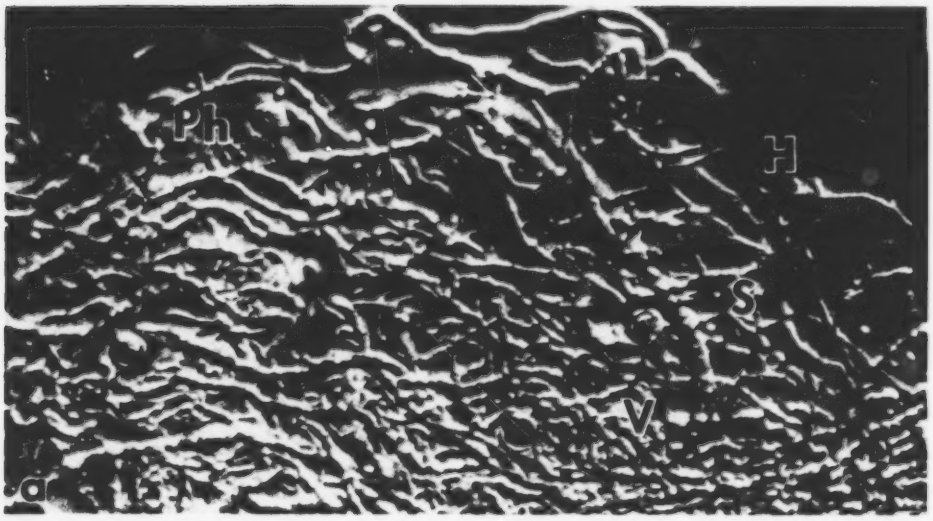
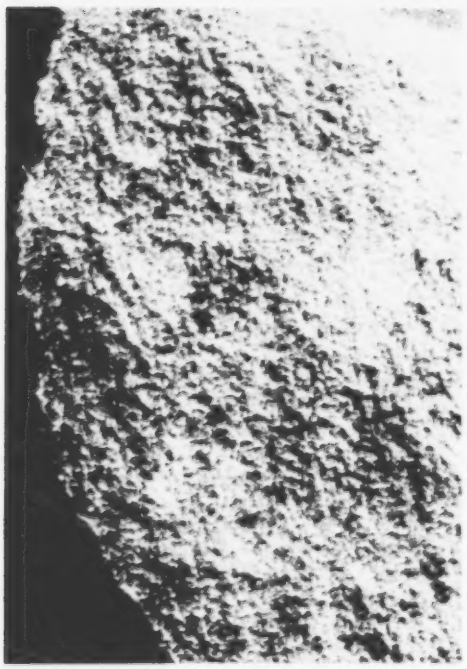


FIGURE 6a. Colonie de l'isolat Frankia ACN8a cultivé dans le milieu Qmod B pendant trois semaines (barre=50 µm). FIGURE 6b. Figure 6a magnifiée. Champ typique sans sporanges (barre=10 µm). FIGURE 6c. Petit sporange rare (sS, seul sporange trouvé dans cette colonie (barre=10 µm)).





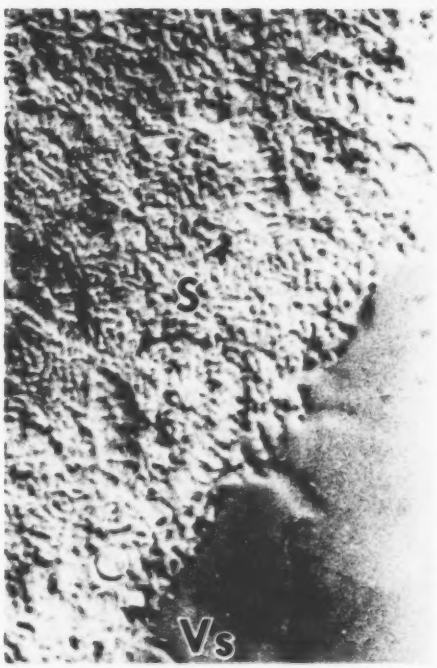


FIGURE 7a. Isolat SCN10a cultivé dans le milieu Qmod B pendant trois mois. Noter le nombre de vésicules. Système optique à contraste par interférence (barre=10 µm); <<S>> désigne un sporange, <<pH>>, le hyphe-mère d'une vésicule, <<H>>, les hyphes ramifiés et <<V>>, les vésicules. FIGURE 7b. Noter l'épaisseur et la densité de la colonie SCN10a, attribuable à une matrice de nature apparemment polysaccharide (barre=50 µm). FIGURE 7c. Petit sporange (S) et vésicules (V) incrustés dans la matrice (barre=10 µm).

FIGURE 8a. Section d'une nodosité de type Sp^+ montrant des sporanges inter- et intracellulaires. FIGURE 8b. Sac de croissance utilisé pour les essais d'infectivité sur les isolats Frankia.

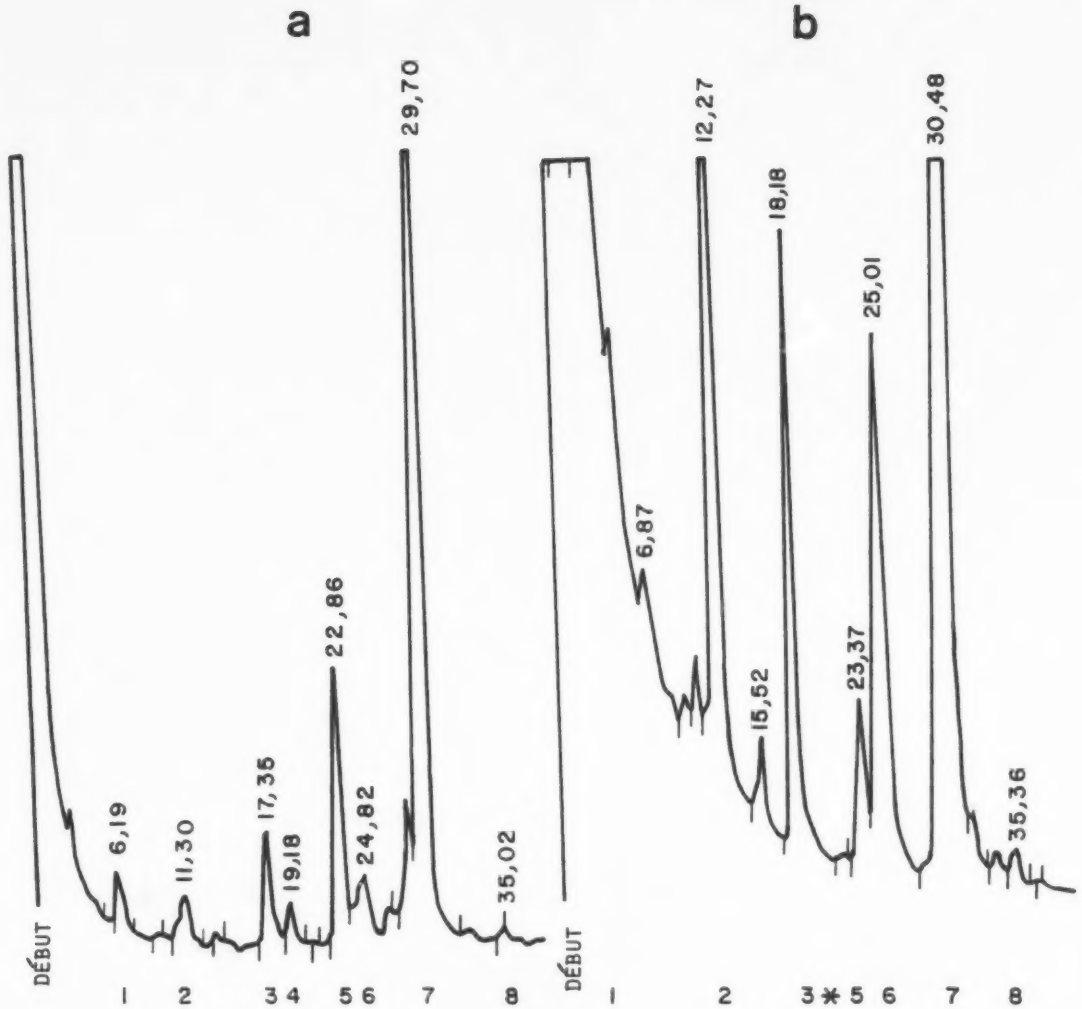


FIGURE 9. Chromatogrammes des dérivés de l'acétate alditol d'hydrolysats de cellules entières des souches Frankia TN15a^{AC} (a) et d'Actinoplanes philippinensis (b) obtenus par la méthode décrite dans le texte (section 3,2,3). Les pics sont, dans l'ordre, (1) rhamnose, (2) ribose, (3) xylose, (4) 2-O-méthyl-D-mannose, (5) mannose, (6) galactose, (7) glucose et (8) inositol. L'astérisque indique le temps de retenue de 2-O-méthyl-D-mannose absent des chromatogrammes d'Actinoplanes.

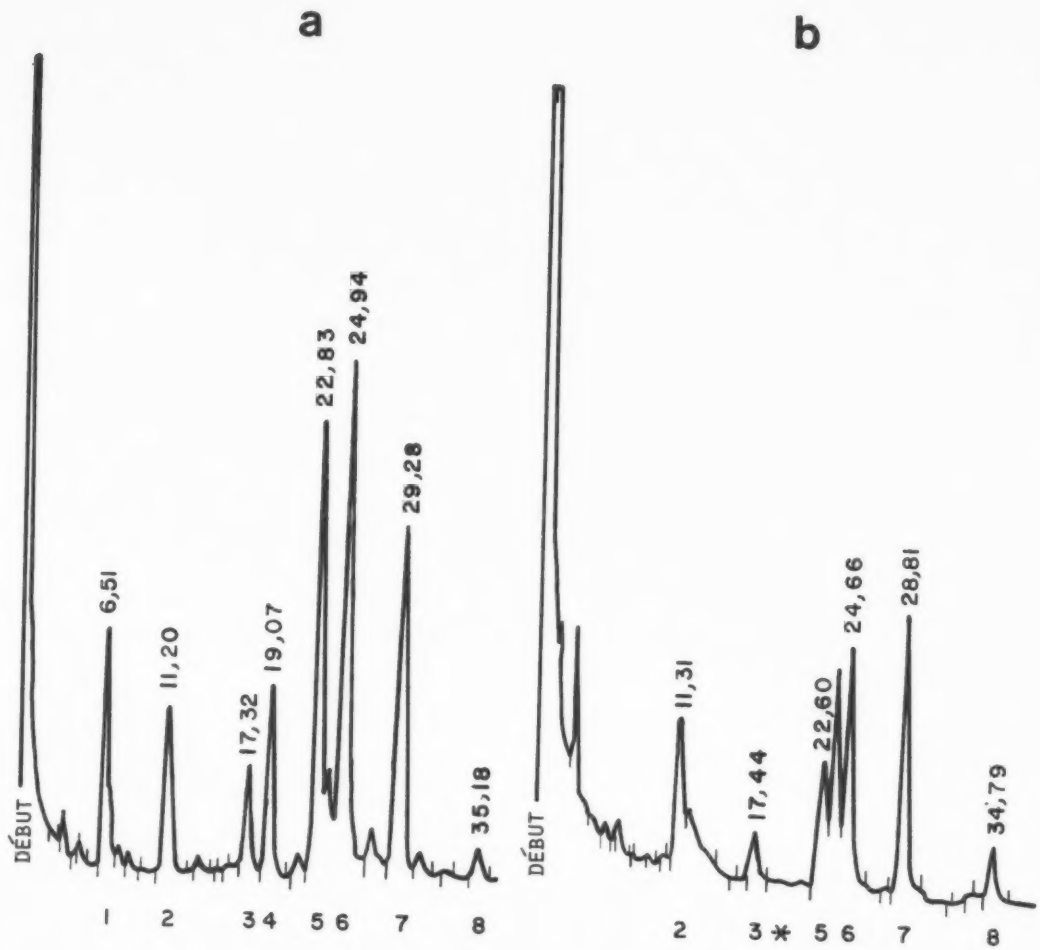


FIGURE 10. Chromatogrammes des dérivés de l'acétate alditol de la <<fraction de paroi du filtre>> (a) et de la <<fraction de filtre 0,22 m>> de la souche Frankia (b) ARgP5AG. L'astéristique indique l'endroit où le pic de 2-O-méthyl-D-mannose aurait dû se trouver dans la fraction du filtrat.

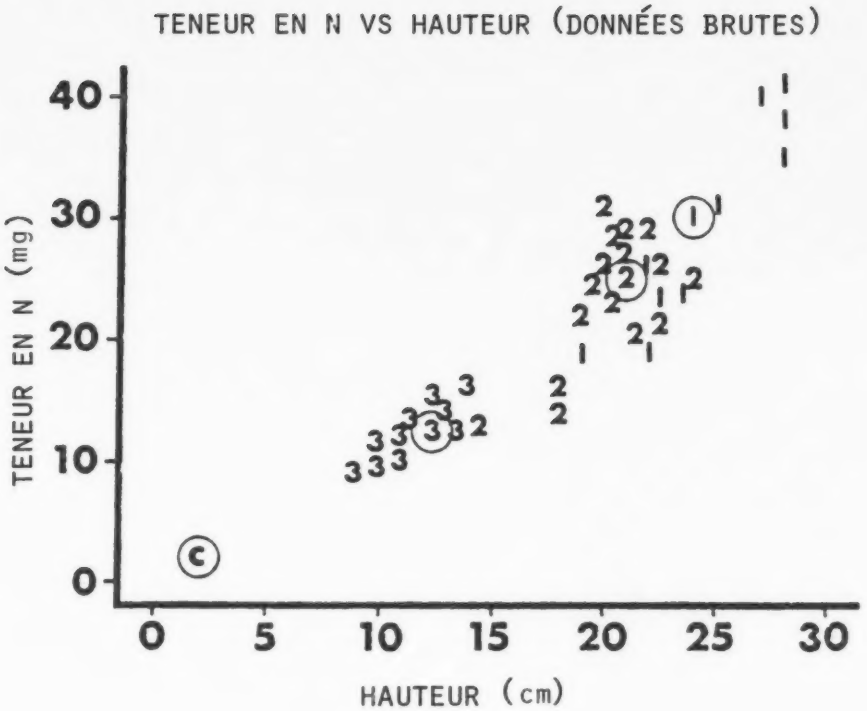


FIGURE 11. Graphique de la teneur en N en fonction de la hauteur, illustrant la variation entre les deux paramètres. Les nombres qui apparaissent sur le diagramme désignent les trois tests successifs (n^{os} 1, 2 et 3) et sont les moyennes de chaque isolat. Les chiffres 1, 2 et 3 encerclés sont les moyennes globales de chaque test visant à montrer la différence provoquée par diverses conditions de croissance (différences de température et différences de retard d'inoculation après le semis). <<C>> est la moyenne de tous les témoins.

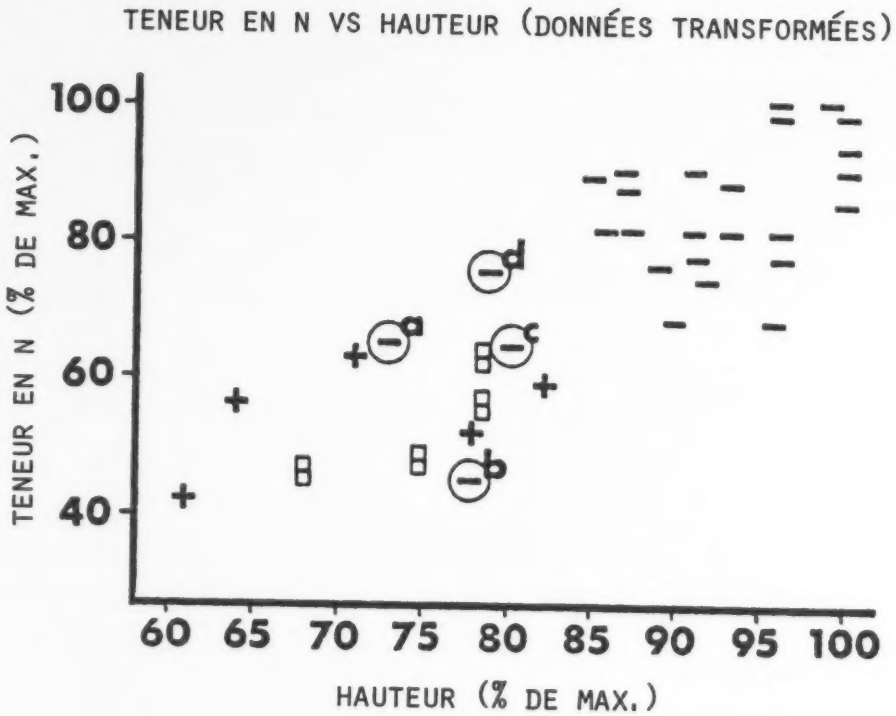


FIGURE 12. Graphique de la hauteur en fonction de la teneur en azote des pousses, exprimées toutes deux en pourcentage du meilleur résultat obtenu dans chaque test d'efficacité. <<+>> désigne les isolats de type Sp^+, et <<->>, les isolats de type Sp^-; <<8>> désigne les isolats ACN8, et <<0>>, les isolats de type Sp^- trouvés dans la grappe Sp^+ (1, ARgN18d; 2, ACN11b; 3, ARgN14a et 4, TN15$\frac{AC}{d}$).

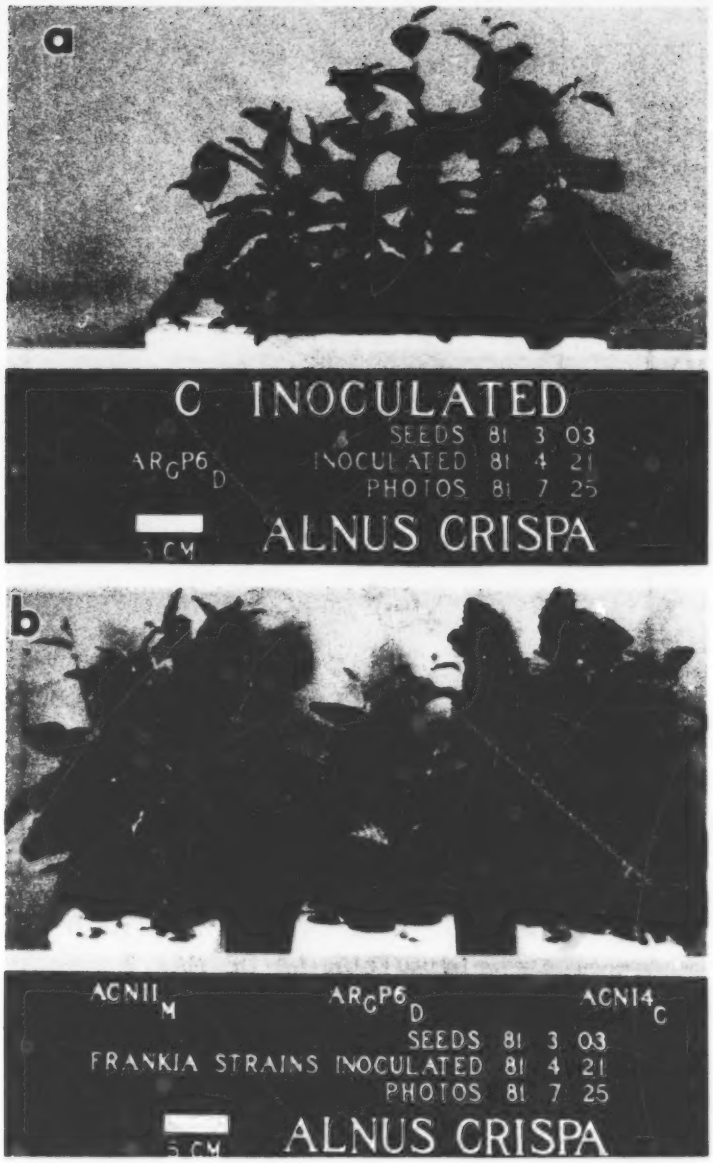


FIGURE 13a. Semis d'Alnus crispa inoculés avec l'isolat Frankia ARgP6d et, à gauche, le groupe témoin (c) qui n'a pas été inoculé; toutes les plantes ont été cultivées dans des blocs de styromousse n° 8 remplis de turface.
FIGURE 13b. A. crispa inoculé avec ACN11m, ARgP6d et ACN14c. Noter la différence de hauteur et de vigueur entre les semis du centre, inoculés avec un isolat de type Sp^- et ceux des côtés, inoculés avec les isolats de type Sp^-, plus efficaces.

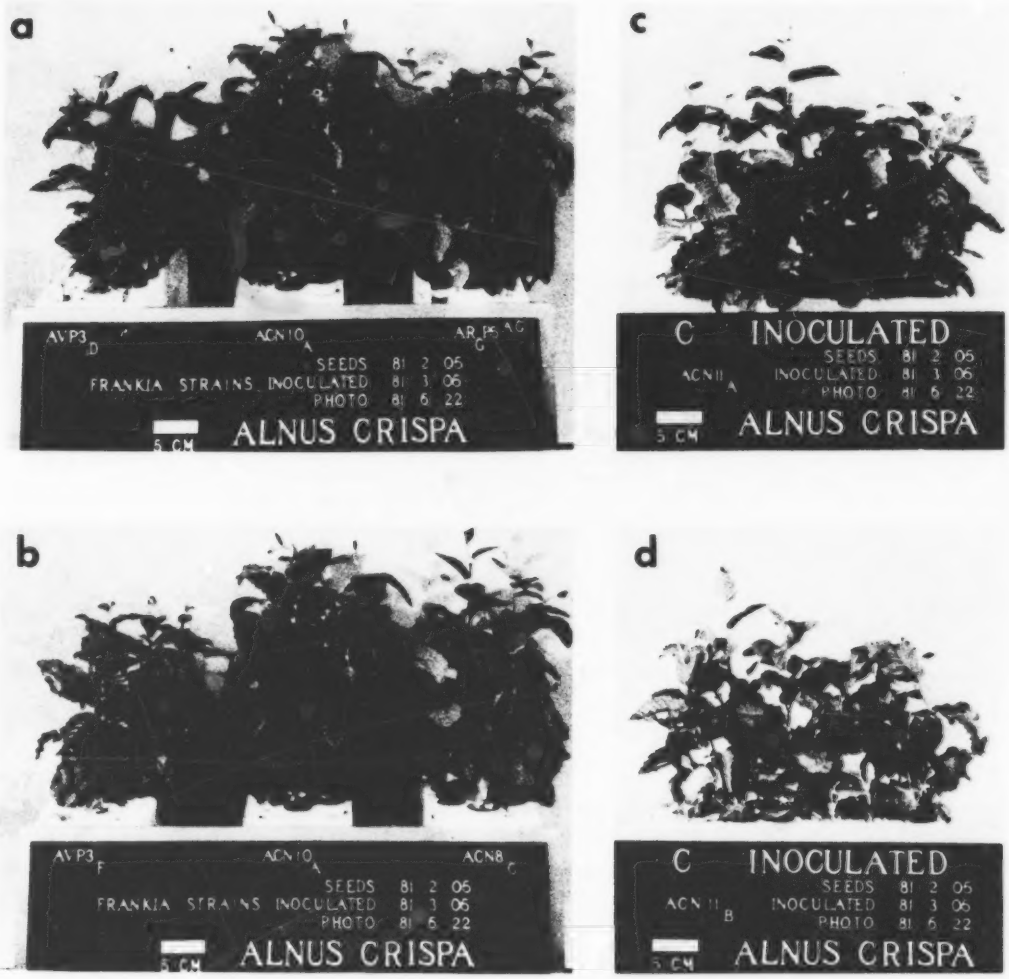


FIGURE 14a. Semis d'A. crispa inoculés avec les isolats AVP3d, ACN10a et ARgP5^{AG}. ACN10a, un isolat de type Sp$^-$, a été l'isolat le plus efficace testé dans le test n° 1; ARgP5^{AG}, un isolat de type Sp$^+$, a obtenu des résultats intermédiaires; et AVP3d, un autre isolat Sp$^+$, a obtenu les moins bons résultats. FIGURE 14b. Semis d'A. crispa inoculés avec les isolats AVP3f, ACN10a et ACN8c. AVP3f et ACN8c ont donné des résultats comparables même si AVP3f était de type Sp$^+$ et ACN8c de type Sp$^-$. FIGURES 14c et 14d. Semis d'A. crispa inoculés avec ACN11a (14c) et ACN11b (14d). Noter la différence de la densité du feuillage et de la hauteur entre les deux, qui proviennent de la même origine.

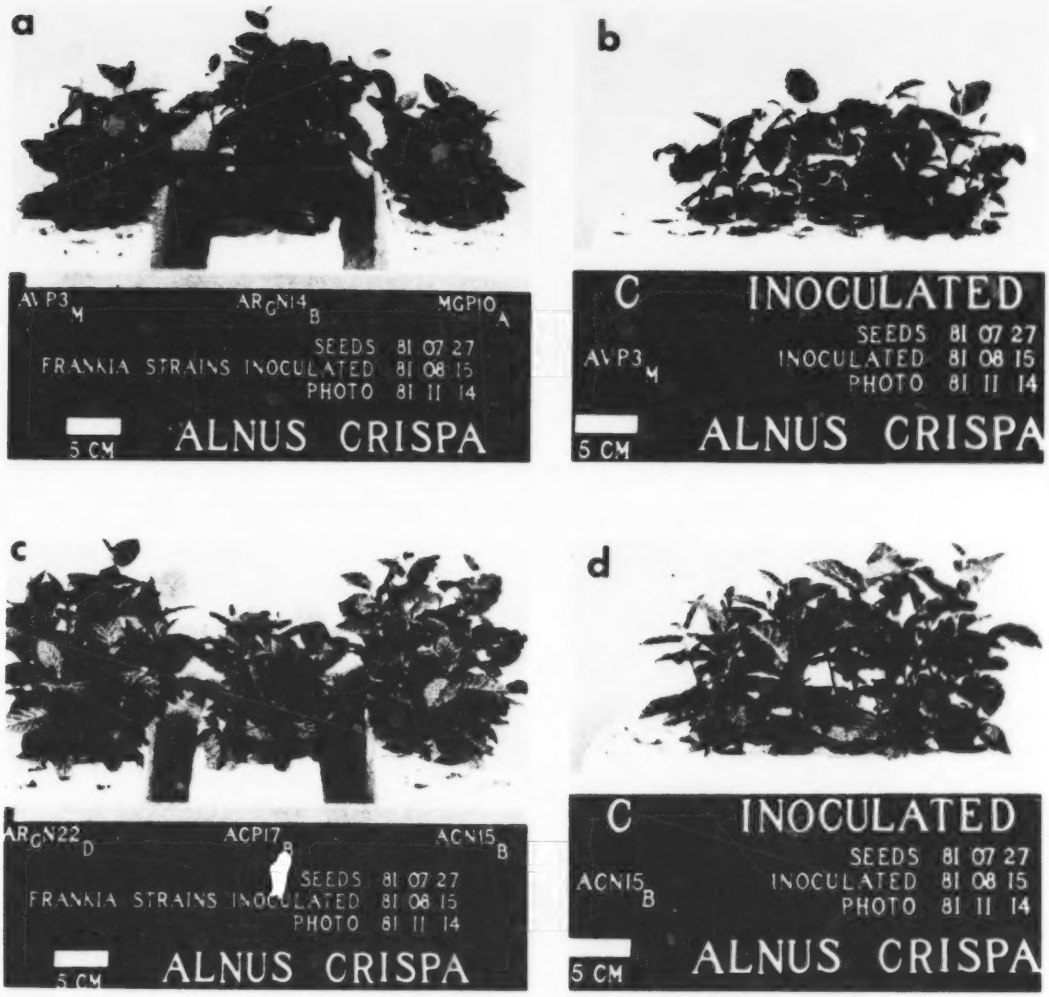


FIGURE 15a. Semis d'A. crispa inoculés avec les isolats AVP3m, ARgN14b et MGP10a. MGP10a a été l'isolat le moins efficace du test n° 3, AVP3m a été le deuxième moins efficace et ARgN14b, l'un des plus efficaces. FIGURE 15b. Vue latérale des semis d'A. crispa inoculés avec AVP3m. Noter l'effet sur le bord, mais également la faible amplitude de variation et les plantes témoins rabougries privées de N (c). FIGURE 15c. A. crispa inoculé avec ARgN22d, ACP17b et TN15$\frac{AC}{b}$ (ACN15b dans la photo, l'acronyme a changé par la suite). L'efficacité n'a pas été reliée au type de spore de la plante hôte d'origine. FIGURE 15d. Vue latérale des semis inoculés avec TN15$\frac{AC}{}$ (ACN15b).

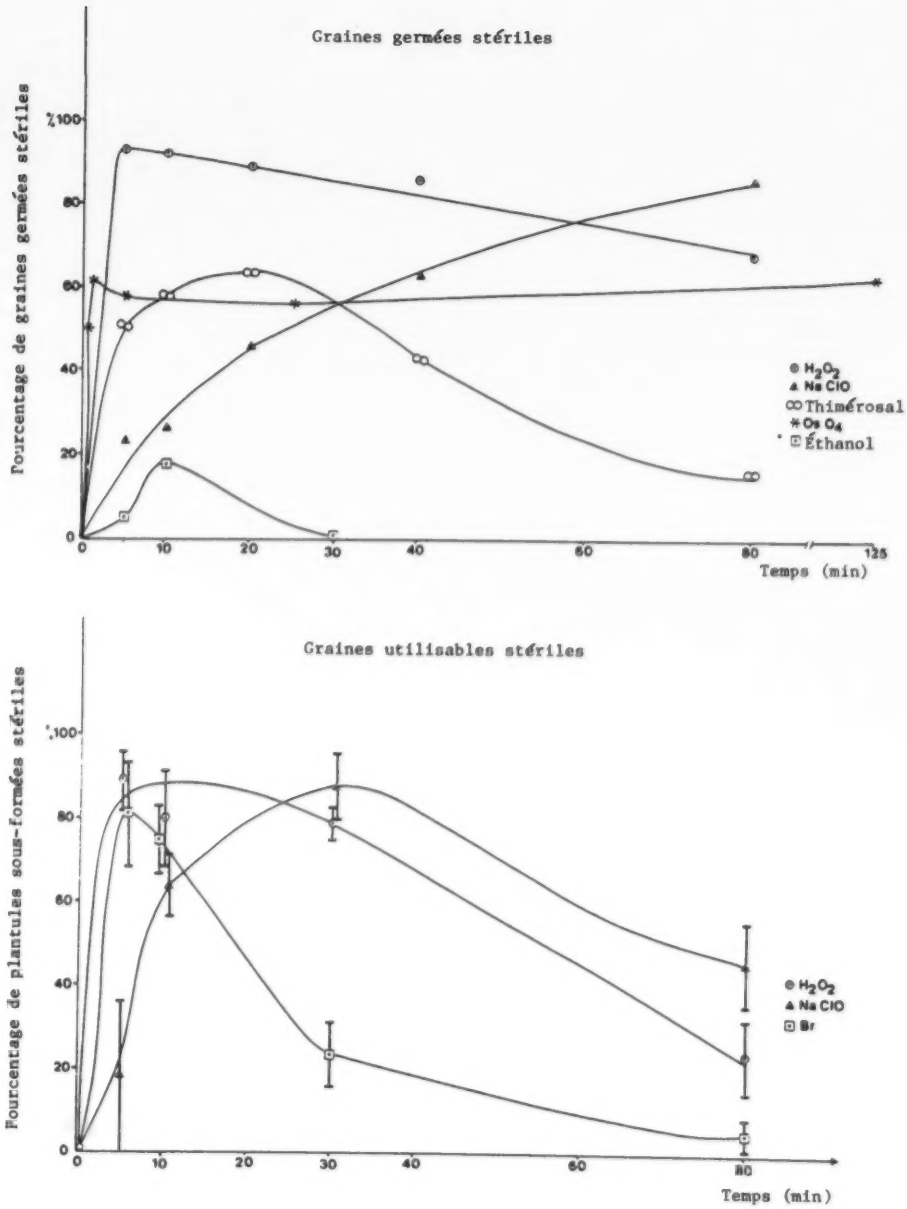


FIGURE 16a. Le pourcentage de semis d'A. crispa axéniques germés cinq jours après une stérilisation de surface selon des méthodes différentes. Le taux de germination du groupe témoin sur sable quartzeux a été de 95 %. FIGURE 16b. Le pourcentage des graines ayant donné des semis axéniques et normaux (moyenne ± SD), la germination témoin sur sable quartzeux était de 95 %. La différence de forme de la courbe du H_2O_2 comparativement à la figure précédente est attribuable au fait qu'après une immersion prolongée, on observe une augmentation du nombre de semis déformés. La différence dans l'optima de la courbe NaClO est causée par le mode d'action de l'hypochlorite qui atteint les téguments par digestion et donne des résultats erratiques.